



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DEBORAH MARGATHO RAMOS GONÇALVES

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM MULHERES COM ENDOMETRIOSE E
DOR USUÁRIAS DO IMPLANTE LIBERADOR DE ETONOGESTREL OU SISTEMA
INTRAUTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL: ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO

*ASSESSMENT OF BIOMARKERS AMONG WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS-
ASSOCIATED PAIN USERS OF THE ETONOGESTREL-RELEASING
CONTRACEPTIVE IMPLANT OR 52-MG LEVONORGESTREL-RELEASING
INTRAUTERINE SYSTEM: RANDOMIZED CLINICAL TRIAL.*

CAMPINAS

2018

DEBORAH MARGATHO RAMOS GONÇALVES

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM MULHERES COM ENDOMETRIOSE E
DOR USUÁRIAS DO IMPLANTE LIBERADOR DE ETONOGESTREL OU SISTEMA
INTRAUTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL: ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO

*ASSESSMENT OF BIOMARKERS AMONG WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS-
ASSOCIATED PAIN USERS OF THE ETONOGESTREL-RELEASING
CONTRACEPTIVE IMPLANT OR 52-MG LEVONORGESTREL-RELEASING
INTRAUTERINE SYSTEM: RANDOMIZED CLINICAL TRIAL.*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências da
Saúde, na área de concentração de Fisiopatologia Ginecológica

*Dissertation presented to the Faculty of the University of
Campinas as fulfillment of the requirements for the degree of
Master in Sciences area of Gynecological Pathophysiology*

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES
ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA DEBORAH MARGATHO RAMOS GONÇALVES

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2015/20504-9; CNPq, 573747/2008-3

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G586a Gonçalves, Deborah Margatho Ramos, 1975-
Avaliação de biomarcadores em mulheres com endometriose e dor usuárias do implante liberador de etonogestrel ou sistema intrauterino liberador de levonorgestrel : ensaio clínico randomizado / Deborah Margatho Ramos Gonçalves. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Luis Guillermo Bahamondes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Endometriose. 2. Dor pélvica. 3. Biomarcadores. 4. Dispositivos intrauterinos medicados. 5. Anticoncepcionais. 6. Etonogestrel. I. Bahamondes, Luis Guillermo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Assessment of biomarkers among women with endometriosis-associated pain users of the etonogestrel-releasing contraceptive implant or 52-mg levonorgestrel releasing intrauterine system : randomized clinical trial

Palavras-chave em inglês:

Endometriosis

Pelvic pain

Biomarkers

Intrauterine devices, Medicated

Contraceptives

Etonogestrel

Área de concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luis Guillermo Bahamondes [Orientador]

Maurício Simões Abrão

Arlete Maria dos Santos Fernandes

Data de defesa: 23-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DEBORAH MARGATHO RAMOS GONÇALVES

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

MEMBROS:

1. PRESIDENTE: PROF. DR LUIS GUILLERMO BAHAMONDES
2. PROFA. DRA. ARLETE MARIA DOS SANTOS FERNANDES
3. PROF. DR. MAURÍCIO SIMÕES ABRÃO

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 23-08-2018

DEDICATÓRIA

Dedico essa obra a todas as mulheres, principalmente aquelas que sofrem com dor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de certa forma cruzaram meu caminho nesta jornada. Primeiramente a todas as mulheres participantes do estudo, obrigada pela confiança. Agradeço aos funcionários do CEMICAMP, do Ambulatório de Planejamento Familiar, profissionais da higiene e limpeza, recepcionistas, técnicas de enfermagem, enfermeiras, médicos e docentes (Dra Ilza, Dra Arlete, Dra Daniela, Dra Cristina), são tantos que não quero me esquecer de ninguém. Agradeço a Dra Larissa, patologista, que me orientou na macroscopia, microscopia, fotografia e análise das lâminas. Agradeço a enfermeira Ximena, pelo seu carinho e sua fundamental ajuda na seleção e recrutamento das participantes. Agradeço muito a Adriana e a Lusía, que foram meus braços direito e esquerdo e sempre estavam prontas para qualquer ajuda, a qualquer momento. Agradeço meu orientador pela oportunidade que tive em participar desta pesquisa, pelos ensinamentos, pela paciência e pela admirável prontidão. Agradeço aos meus familiares, meus pais, meus irmãos, meus sobrinhos, meu sogro, por entender que em qualquer fase da vida, nunca é tarde para aprender e nunca é tarde para difundir nossas experiências e conhecimentos. Agradeço muito à tia Vana e à Amanda pela paciência e pela força que me deram desde o esboço de minhas idéias. Agradeço aos meus queridos filhos, Marina e Henrique, pela compreensão e pelo entendimento de que nós nunca perderemos se estudarmos e pelo fato de estarem comigo sempre. Agradeço em especial ao meu marido, Gian, que sempre, mas sempre, me apoiou para que isso um dia se tornasse realidade. Sem você acredito que isso seria impossível. Obrigada por sempre me fazer acreditar que eu posso conseguir. Agradeço a Deus pela minha vida e por todos estarmos bem.

Agradeço o apoio financeiro do CNPq e FAPESP.

Apoio financeiro: FAPESP #2015/20504-9 e CNPq # 573747/2008-3

Merck concedeu apoio financeiro projeto # 37228

Os Sistemas Intrauterinos liberadores de Levonorgestrel foram doados pela International Contraceptive Access Foundation, Turku, Finlândia

RESUMO

A endometriose é uma doença pélvica benigna, inflamatória, estrogênio dependente que afeta mulheres em idade reprodutiva. É caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina. O diagnóstico padrão ouro é cirúrgico. O tratamento pode ser cirúrgico e medicamentoso, indicado isoladamente e ou complementarmente. O objetivo do tratamento clínico é reduzir a produção estrogênica e com isto a inflamação. Os contraceptivos hormonais são efetivos no tratamento e com baixo custo. Entre as opções de somente progestogenio estão disponíveis o sistema intrauterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) com 52 mg o qual tem sido estudado em mulheres com endometriose e dor, com resultados positivos, porém há poucos estudos com o implante liberador de etonogestrel (ENG) para essa finalidade. O objetivo deste estudo foi o de avaliar os escores de dor pélvica crônica e dismenorreia, os níveis séricos dos marcadores CA-125 e CD 23 e densidade de fibras nervosas em mulheres com dor associada à endometriose antes e após 6 meses do uso do SIU-LNG ou do implante de ENG. O estudo foi um ensaio clinico, aberto, randomizado, conduzido no Departamento de Tocoginecologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, no período de outubro de 2016 a outubro de 2017. Foram incluídas 103 mulheres com dor pélvica associada à endometriose. Foram alocadas 52 mulheres para o implante com ENG e 51 para o uso de SIU-LNG. As avaliações dos escores de dor pélvica, dismenorreia e dos marcadores foram realizadas ao inicio do estudo e após 180 dias do uso do método alocado. RESULTADOS: Ambos contraceptivos reduziram os escores de dor pélvica crônica, dismenorreia, as concentrações de CD 23 solúvel e densidade de fibras nervosas ($p < 0.001$); entretanto, apenas o CA-125 mostrou redução significativa entre as usuárias do implante de ENG ($p < 0.05$). Nenhuma correlação foi observada entre a redução dos escores de dor e dismenorreia com a redução dos biomarcadores. Conclusão: O implante de ENG e o SIU-LNG reduzem significativamente as concentrações do CD 23 solúvel e densidade de fibras nervosas; entretanto, apenas as concentrações do CA 125 reduziram entre as usuárias do implante de ENG. A redução dos biomarcadores não foi correlacionada a melhora dos escores de dor pélvica e dismenorreia pela EVA. Nenhuma diferença foi observada entre as usuárias do implante de ENG e do SIU-LNG.

Palavras-chaves: Endometriose; dor pélvica crônica; dismenorreia; sistema intrauterino liberador de levonorgestrel; implante de etonogestrel; CA-125; CD-23 solúvel; densidade de fibras nervosas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Endometriosis is a chronic, benign, inflammatory, estrogen-dependent disease that affects women in reproductive age. It is characterized by the presence of endometrial tissue, with glandular or stromal pattern, outside the uterine cavity inducing a local inflammatory response. The gold standard diagnosis is surgical. However, due to the fact that surgery is invasive diagnostic tools, several biomarkers have recently been proposed as non-invasive diagnosis tools for endometriosis. The treatment may be surgical and medicated; they are indicated alone and or complementarily. The goal of clinical treatment is to reduce estrogen production and thereby inflammation. Hormonal contraceptives are effective and inexpensive. The hormonal options containing progestogen have few side effects and long-acting methods. There is a 52 mg levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS), which has been extensively studied in women with endometriosis and pain, with positive results, but few studies with the etonogestrel-releasing implant (ENG) for this purpose. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to compare pelvic pain and dysmenorrhea scores, CA-125, CD23 soluble serum levels and fiber nerve density in women with endometriosis associated pain before and after 6 months of use of the LNG-IUS or the ENG implant. **MATERIALS AND METHODS:** An open, randomized clinical trial conducted at the Department of Obstetrics and Gynecology of the University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil, from October 2016 to October 2017. A total of 103 women with endometriosis associated pelvic pain with surgical diagnosis or by transvaginal ultrasound and magnetic resonance imaging, aged 18-45 years, were allocated to use an ENG-implant or a LNG-IUS. Fifty-two women were allocated to the implant with ENG and 51 for the use of LNG-IUS. Serum levels of CA-125, CD23 soluble and endometrial nerve fiber density were assessed before and after 6 months of use of the devices and were correlated to VAS pain and dysmenorrhea scores. **RESULTS:** Both contraceptives reduced the concentrations of serum CD-23 soluble levels and endometrial nerve fiber density ($p < 0.001$); however, the CA-125 only showed a significant reduction among users of the ENG-implant ($p < 0.05$). No correlation was observed between pain and dysmenorrhea scores decrease and biomarkers decrease. **CONCLUSIONS:** ENG-implant and the 52-mg LNG-IUS reduced significantly the serum CD 23 soluble levels and endometrial nerve fiber density; however, CA-125 was only reduced among users of the ENG-implant. The reduction of biomarkers was not correlated to improvement of VAS pain and dysmenorrhea scores. No differences were observed between the ENG-implant and the LNG-IUS.

Key-words: Endometriosis; pelvic pain; dysmenorrhea; levonorgestrel-releasing intrauterine system; etonogestrel implant; CA-125; CD-23 soluble; fiber nerve density.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACHO	– anticoncepcionais combinados hormonais orais
a-GnRH	– agonista do hormônio liberador de gonadotrofina
ANOVA	– Análise de variância
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASRM	– sigla em inglês - <i>American Society for Reproductive Medicine</i> (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)
CA-125	– sigla em inglês - <i>cancer antigen 125</i>
CAISM	– Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher
CD	– sigla em inglês – <i>cluster of differentiation</i>
ENG	– etonogestrel
EVA	– Escala Visual Analógica de dor
FAPESP	– Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCM	– Faculdade de Ciências Médicas
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgE	– Imunoglobulina E
IMC	– índice de massa corpórea
LH	– hormônio luteinizante
MHz	– mega Hertz
MS	– Ministério da Saúde
MSD	– Merck Sharp Dohme
PBS	– sigla em inglês - <i>phosphate buffer saline</i>
PCR	– sigla em inglês - <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGP 9.5	– produto de gene da proteína 9.5

RNAm	– ácido ribonucleico mensageiro
rpm	– rotações por minuto
SIU-LNG	– Sistema intrauterino liberador de levonorgestrel
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U	– unidade internacional de medida
UNICAMP	– Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. SUJEITOS E MÉTODOS	22
3.1. Desenho do estudo	22
3.2. Tamanho amostral	22
3.3. Seleção dos sujeitos	22
3.4. Critérios de inclusão:.....	23
3.5. Critérios de exclusão:.....	23
3.6. Critérios de descontinuação:.....	24
3.7. Variáveis	24
3.8. Técnicas de inserção, testes e exames	27
3.9. Acompanhamento dos sujeitos	31
3.10. Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	34
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS.....	65
8. ANEXOS	71
Anexo 1. Estadiamento da endometriose pela ASRM(12).....	71
Anexo 2: Classificação de Enzian 2012 para endometriose profunda (16).	74
Anexo 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	75
Anexo 4. Escala visual analógica de dor (EVA) (55)	81
Anexo 5. FICHA DE COLETA DE DADOS	82
Anexo 6. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.....	84

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença benigna, inflamatória, estrogênio dependente que afeta mulheres em idade reprodutiva(1,2). É diagnosticada ao se encontrar tecido endometrial, com padrão glandular ou estromal, fora da cavidade uterina induzindo uma resposta inflamatória crônica culminando em dor pélvica, infertilidade ou mesmo ausência de sintomatologia (2, 3). Os sinais e sintomas associados à endometriose indicativos de propedêutica especializada para o diagnóstico são dismenorreia, dor pélvica crônica, dor pélvica não cíclica, dispareunia de profundidade e infertilidade (4-6). Entretanto, há casos de queixas não ginecológicas, não necessariamente cíclicas em que devem-se suspeitar da doença, como disquezia, disúria, hematúria e hematoquezia (7,8).

A endometriose é uma patologia que foi descrita pela primeira vez em 1860 pelo médico patologista Carl Von Rockitansky (8). Em 1921 John Sampson propôs a teoria mais aceita até a atualidade, em que sugeriu que o fluxo retrogrado menstrual fosse o principal fator na sua etiopatogenia (6, 8). Há outras teorias que tentam explicar a etiologia da endometriose, embora elas ainda sejam insuficientes para estabelecer relação causa e efeito. Dentre estas incluem a modificação de células epiteliais na superfície peritoneal (por metaplasia celômica), metaplasia de remanescentes embrionários dos ductos de Müller, anormalidades do sistema imunológico, a disseminação de células endometriais através da circulação ou do sistema linfático, susceptibilidade genética (9). Os mais frequentes locais de distribuição das lesões de endometriose apoiam fortemente a teoria de Sampson, os implantes são mais encontrados no compartimento posterior da pelve e ao lado esquerdo da pelve, principalmente região de sigmóide (9). Embora a teoria da menstruação retrógrada se mostre a mais convincente na patogênese da endometriose, ela não consegue explicar as diferentes formas de apresentação da doença, como endometriose cerebral, pulmonar, em cicatriz cirúrgica e a rara ocorrência em homens (4). Nisolle e Donnez, propuseram que a endometriose peritoneal, nódulos de adenomiose, endometriose de septo retovaginal e endometriomas teriam patogêneses diferentes (10). Em estudos mais recentes, foi proposto que a recorrência de dano tecidual com reparo pela menstruação retrograda levaria a reação inflamatória local e fibrose ou levando a alterações

epigenéticas, podendo ser o início da formação da lesão de endometriose profunda (11).

É difícil discorrer sobre incidência da doença visto que há casos assintomáticos além de inúmeros com melhora com tratamento clínico. A prevalência da endometriose ainda permanece desconhecida, porém estima-se que seja em torno de 2 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (1, 9). Em mulheres que são submetidas a laparoscopia, a prevalência foi observada em 4,1% nas mulheres assintomáticas, 20 a 40% nas inférteis (4) e de até 60% naquelas com dor pélvica (2, 9).

A endometriose continua sendo um desafio diagnóstico e terapêutico (1). O diagnóstico considerado “padrão ouro” é cirúrgico, através da visualização de lesões por meio da laparoscopia ou laparotomia e não necessariamente com confirmação anátomo-patológica da lesão (1). As regiões geralmente mais acometidas são os ovários, ligamentos uterossacros, fundo de saco de Douglas e trato gastrointestinal (incidência de 12 a 37%), recesso vesico-vaginal e trato gênito-urinário (incidência entre 0,01 e 1,2%), peritônio pélvico, cervix uterina, vagina, tecido subcutâneo, tubas uterinas e diafragma. A transformação maligna é descrita, embora rara (menos de 1,5% dos casos) sendo 75% destes observados de crescimento proveniente de endometriose ovariana (4).

Morfologicamente a endometriose pode se apresentar como superficial ou profunda e ovariana (10). Na forma superficial ou peritoneal pode ocorrer nos ovários, no peritônio, serosas teciduais, apresenta-se como manchas ou pontos negros, acastanhados, nódulos, pequenos cistos com focos de hemorragia antiga, podendo ou não ocorrer fibrose ao redor. Lesões atípicas podem ser encontradas na forma de implantes avermelhados em “chama de vela” ou “falha” de preenchimento peritoneal (9). A endometriose ovariana é denominada endometrioma, e consiste em cistos ovarianos formados por tecido endometrial. A endometriose profunda é infiltrativa com nódulos aprofundando-se além de 5 mm da superfície peritoneal, pode envolver ligamentos útero-sacro, vagina, intestino, bexiga, ureteres associando-se a fibrose e hiperplasia muscular e infiltração nervosa (7, 11, 12). A infiltração profunda promove quadro algico mais evidente por maiores chances de comprometimento nervoso (1). No entanto há uma discrepância em muitos casos entre o nível de dor e o estadio (grau) de endometriose, isto exemplifica que a

fisiopatologia da dor relacionada à endometriose se mostra incerta até o momento principalmente nos casos de endometriose peritoneal e dor pélvica crônica (4, 9).

Tendo em vista que o método padrão ouro para o diagnóstico da endometriose é cirúrgico, a classificação mais aceita é a da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, 1997), por meio de escores pontuados, em que é dividida por graus e variando de I a IV, sendo I, endometriose mínima, com soma de pontos de um a cinco; II, endometriose leve, com seis a 15 pontos; III, endometriose moderada, com soma de pontos de 16 a 40 e IV, endometriose severa, com soma de pontos maior que 40 (7).

Em 2005 foi proposta uma classificação por meio de escores para a avaliação da endometriose por métodos de imagem, especificamente pela ressonância nuclear magnética (RNM) (13) e posteriormente pela ultrassonografia (US), para descrições de endometriose profunda principalmente para mapear endometriose infiltrativa em retroperitônio e orientar o cirurgião no planejamento cirúrgico (12-14). Esta classificação, denominada Enzian, avalia a doença nos três compartimentos e seu envolvimento com estruturas retroperitoneais, severidade, presença de doença à distância, tamanho e bilateralidade (15). É complementar ao escore da ASRM. Seu escore combina as estruturas por compartimentos anatômicos e grau de invasão. Sendo compartimento A: septo reto-vaginal e vagina, compartimento B ligamento útero-sacro e peritônio, compartimento C reto e sigmóide. Em relação ao grau de invasão: grau 1, invasão menor que 1 cm; grau 2, invasão entre 1-3 cm; e grau 3 invasão maior que 3 cm.

Em 2016, o Grupo Internacional de Análise de Endometriose Profunda publicou um consenso sobre o uso sistemático da US para avaliação da pélvis em mulheres com endometriose com base na classificação de Enzian (12, 15). Com isto, métodos de imagem como RNM e US com preparo podem sugerir diagnóstico da doença com alta acurácia. Atualmente, devido aos riscos que a cirurgia para endometriose profunda pode acarretar, a formação de aderências e fibroses, a redução da reserva ovariana, o manejo desta patologia tende a ser feito por tratamento clínico, sendo a cirurgia evitada ou indicada em situações específicas como não melhora da dor após tratamento clínico com piora da qualidade de vida, presença de endometrioma com mais de 4 cm de diâmetro, endometriose em íleo, apêndice, ureter e acima de 40% de comprometimento da circunferência do retossigmóide (1, 16).

O implante endometriótico promove uma resposta inflamatória local, proliferação celular, invasão e neoangiogênese, propiciando progressão e recorrência da doença (9). Há aumento da produção de mediadores inflamatórios como citocinas e prostaglandinas (2). Além de fatores de crescimento, hormônios, enzimas proteolíticas, auto-anticorpos, glicoproteínas e moléculas de adesão. Muitos marcadores biológicos têm sido pesquisados para melhor correlação, diagnóstico e controle de tratamento da endometriose (17). As amostras estudadas são provenientes de fluidos peritoneais, tecido endometrial eutópico e ectópico, urina e sangue periférico (18-20).

Dentre os diversos biomarcadores, o CA-125 é o mais estudado (18, 20-24). Trata-se de uma glicoproteína de alto peso molecular que se origina em células epiteliais normais produzidas pelo epitélio amniótico e celômico durante o período de desenvolvimento embrionário (mesotélio da pleura, pericárdio e peritônio). O aumento de sua concentração está associado a diversas patologias ginecológicas. Em células teciduais de adultos o CA-125 é detectado em epitélios de origem celômica normal e neoplásica, como epitélio endometrial, endocervical, epitélio das tubas de Falópio e células epiteliais de câncer ovariano. Desde 1986 tem sido utilizado para diagnóstico de recorrência da endometriose e avaliação do sucesso terapêutico, porém não para diagnóstico da doença (1, 7, 21, 22).

Tem-se pesquisado e proposto que fatores imunes estão associados à patogênese da endometriose, com inúmeros estudos que avaliaram resposta inflamatória e neoangiogênese (6). Além de aumento de interleucinas promovido pela resposta inflamatória oriunda do implante endometriótico, ocorre ativação de citocinas, fatores de crescimento, que levarão à ativação de linfócitos B liberando com isso, uma concentração maior da fração solúvel do CD-23, expresso na membrana celular (18, 25). É referido como receptor de baixa afinidade para IgE em células B, eosinófilos, monócitos, células dendríticas, epiteliais, células de Langerhans e plaquetas (25-27).

A neoangiogênese está associada à sustentabilidade das lesões endometrióticas e a proliferação nervosa acompanha esse rico suprimento vascular (9). Além do mais, o endométrio eutópico das pacientes com endometriose pode exibir um padrão aberrante de expressão molecular que lhe permite a habilidade de invasão e desenvolvimento do foco endometriótico ectópico (19). Isso poderia explicar a presença de pequenas fibras nervosas no endométrio e miométrio de

pacientes com endometriose assim como nas lesões endometrióticas. A densidade destas fibras nervosas na camada funcional endometrial está aumentada em mulheres com endometriose (28-31) podendo haver uma correlação positiva com escores de dor perimenstrual (32, 33).

Em relação ao controle da dor dessas pacientes, há diversos tratamentos propostos, entre eles cirúrgicos com remoção de lesões e medicamentosos com objetivos de reduzir a lesão através da redução da produção estrogênica (1, 34). Existem medicações capazes de controlar e reduzir a dor associada a endometriose como os anti-inflamatórios não esteroidais, os ACHOs, contraceptivos de somente progestogenio, drogas anti-progestogênicas, drogas anti-estrogênicas (danazol), agonistas do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e inibidores da aromatase (1, 34).

Essas drogas são eficazes no controle da dor, sendo o agonista de GnRH a droga teoricamente ideal pela indução de um quadro hipoestrogênico temporário (1, 34, 35). No entanto, além do custo elevado, os efeitos colaterais não são desprezíveis, dentre eles, ganho de peso excessivo, irritabilidade, perda de massa óssea, impossibilitando seu uso por além de 3 a 6 meses (1, 34, 35).

De todas as medicações que podem atuar no controle da dor, os contraceptivos de somente progestogenios são os que apresentam menores efeitos colaterais e passíveis de serem usados por longo prazo com baixos custos (2, 5, 36-38). Além do mais, há opções disponíveis de longa ação, em que não necessitam de lembrança diária ou mensal da tomada, proporcionando níveis séricos hormonais mais estáveis. As opções hormonais de progestogenios de uso prolongado com levonorgestrel (LNG) e etonogestrel (ENG) estão disponíveis na apresentação de sistema intrauterino liberador de LNG (SIU-LNG) e implante subdérmico liberador de ENG.

O LNG e ENG são progestogenios de segunda geração, derivados da 19-nortestosterona (36). Em estudos recentes observou-se que ocorre uma redução da sensibilidade à dor em mulheres saudáveis com uso de progestogenios com efeito androgênico como o ENG e o LNG, principalmente se utilizados por via não oral, por apresentarem níveis séricos constantes de progestogenio, colaborando na neuromodulação da dor e sua percepção (36, 39, 40).

O LNG reduz a expressão de receptores de estrogênios e progestogênios endometriais com isso, induz à atrofia glandular endometrial e regula negativamente

a proliferação de células do endométrio, aumenta a atividade apoptótica e tem efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores locais (41, 42). O SIU-LNG, disponível no Brasil com o nome de Mirena® (Bayer Oy, Turku, Finlândia), libera 20 µg de LNG/dia (43). A distribuição da droga no organismo se apresenta em diferentes concentrações, com vezes maior no endométrio em relação ao miométrio e mil vezes mais elevada no endométrio em relação aos níveis séricos (43). Inicialmente, até 85% das pacientes que usam o SIU-LNG podem apresentar ciclos anovulatórios, porém esta proporção cai para 35% em 12 meses. Além disso, 20-30% podem apresentar amenorréia, contribuindo para a redução da dismenorréia (44).

Em relação ao implante subdérmico liberador de ENG, comercializado com o nome de Implanon® (Merck Sharp & Dohme, Oss, Holanda) no Brasil, apresenta-se na forma de um dispositivo plástico, com 4 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro, contendo 68 mg de ENG (3-ketodesogestrel), metabólito ativo do desogestrel (45). Age a nível hipofisário inibindo o LH e com isto, bloqueia a ovulação em mais de 95% das usuárias (36).

Há diversos estudos tanto prospectivos quanto ensaios clínicos randomizados em que o SIU-LNG provou ser eficaz no alívio de sintomas de dor pélvica, dismenorréia e dispareunia causadas pela endometriose após a cirurgia conservadora (1, 41, 47–49). Em 1999, num estudo prospectivo, 20 mulheres com dor associada à endometriose foram seguidas por 12 meses, após cirurgia de laparoscopia e colocação do SIU-LNG, evidenciando melhora nos escores de dor e dispareunia (48). Em 2001, Fedele et al, acompanharam 11 mulheres com endometriose de septo reto-vaginal, dor pélvica crônica e dispareunia de profundidade as quais receberam SIU-LNG e mantido por 12 meses. Foi observado melhora tanto na dor pélvica quanto na dispareunia de profundidade (49). Em 2003 Vercellini et al, seguiram por 12 meses, 40 pacientes submetidas a cirurgia para endometriose com dor pélvica e dismenorréia intensa. Destas, 20 mulheres não receberam tratamento medicamentoso após a cirurgia e 20 receberam o SIU-LNG. Houve uma redução significativamente estatística no grupo que recebeu a intervenção medicamentosa (50). Lockhat et al, conduziram um estudo prospectivo observacional por seis meses, em que 34 mulheres com dor associada à endometriose receberam o SIU-LNG e melhoraram os sintomas associados à patologia (41). Petta et al, em 2005, conduziram um ensaio clínico randomizado com 82 mulheres com endometriose e dor, em que num braço, 39 mulheres receberam

SIU-LNG e no outro, 43 receberam agonista do GnRH. Houve melhora importante no quadro álgico sem diferença entre os grupos (47). Outro ensaio clínico foi realizado com 44 mulheres com endometriose, dor pélvica crônica e dismenorréia, nas quais 21 mulheres receberam SIU-LNG e 23 agonista do GnRH e seguidas por 6 meses, com verificação de melhora dos sintomas associados à endometriose (46).

Em relação a estudos com o implante de ENG há um ensaio clínico randomizado que seguiu por 12 meses, 41 mulheres para avaliação de melhora da dor pélvica, dismenorréia e dispareunia de profundidade secundária à endometriose, em que 20 mulheres receberam acetato de medroxiprogesterona de depósito e 21 receberam o implante de ENG com melhora no quadro de dor (51). Em 2009 foi realizado um estudo prospectivo em que foram seguidas por 12 semanas, 50 mulheres com dor associada à endometriose e que receberam implante de ENG com melhora da dor (52). Há, ainda, na literatura um artigo publicado em 2005 com cinco relatos de casos sobre o uso do implante de ENG em mulheres com endometriose e dor pélvica com melhora das queixas clínicas em quatro casos (53).

A inflamação é uma das principais causas de dor na endometriose (9). Vários mediadores e resposta imune local são conhecidos por mediar esta resposta (19). A quantificação de mais de um marcador biológico comparativamente à escala visual analógica (EVA) de dor permite uma maior coincidência assertiva (em relação à melhora da dor) quando comparada à avaliação de apenas um único marcador (54). A comparação de um grupo de marcadores com a resposta terapêutica positiva obtida através da melhora do escore de dor pode-se fazer inferência da redução da atividade proliferativa das células epiteliais das lesões endometrióticas.

O SIU-LNG e o implante de ENG podem ampliar o arsenal terapêutico para a redução do escore dor em pacientes acometidas pela endometriose com dor pélvica (24). Com o intuito de melhorar o quadro álgico das mulheres com dor pélvica crônica associada à endometriose propõe-se o uso de medicações hormonais com progestogênios, os quais apresentam boa tolerabilidade, baixos índices de efeitos colaterais, podem ser usadas a longo prazo e são de menores custos quando comparadas às medicações que acarretam em hipoestrogenismo, como os agonistas do GnRH. A utilização de métodos hormonais somente de progestogênios, principalmente por via não oral, está associada ao aumento do limiar de dor em mulheres saudáveis (40) e redução das fibras nervosas sensoriais

no endométrio de pacientes com dor associada à endometriose (37,55,56). Este mecanismo pode desempenhar um importante papel na redução da dor nas usuárias deste tipo de terapêutica.

A verificação das alterações nos níveis séricos de diferentes biomarcadores, como do CA-125, proveniente de expressão de células epiteliais, do CD-23 solúvel expresso pela membrana celular das células B e da densidade de fibras nervosas no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, comparativamente ao escore de dor, permitirá se fazer alusão a melhora da resposta inflamatória. Com isso, o uso de dois métodos hormonais com progestogenio com diferentes vias de administração colaborará na melhor escolha de prescrição em relação ao perfil de cada paciente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar os níveis séricos dos marcadores CA-125, CD-23 solúvel e densidade de fibras nervosas antes e aos 6 meses do uso do SIU-LNG ou do implante de ENG em mulheres com dor associada a endometriose.

2.2. Objetivos específicos

Comparar os níveis séricos de CA-125 basal e aos 180 dias entre mulheres com endometriose e dor usuárias do SIU-LNG versus do implante liberador de ENG.

Comparar os níveis séricos de CD 23 basal e aos 180 dias entre mulheres com endometriose e dor usuárias do SIU-LNG versus do implante liberador de ENG.

Comparar a densidade de fibras nervosas no endométrio basal e aos 180 dias entre mulheres com dor associada a endometriose usuárias do SIU-LNG versus do implante liberador de ENG.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Ensaio clínico, randomizado, aberto, comparativo, no qual foram avaliados níveis séricos dos marcadores CA-125 e CD-23 solúvel e a densidade de fibras nervosas no endométrio de pacientes com dor associada à endometriose antes e aos 6 meses de uso do SIU-LNG ou do implante subdérmico de ENG.

3.2. Tamanho amostral

O tamanho mínimo da amostra foi calculado com base na hipótese de não-inferioridade do implante ENG com relação ao SIU-LNG. Vários estudos de não inferioridade utilizando a EVA para mensurar a dor pélvica associada à endometriose, utilizaram margem de inferioridade de 1,5 cm, entretanto essa margem foi obtida de outras patologias que geram dor crônica, que não endometriose. Gerlinger sugeriu uma margem de não-inferioridade de 1,0 cm nos estudos de dor pélvica crônica associada à endometriose (54). Considerando uma margem de não-inferioridade de 1,5 cm ($\pm 2,5$ cm de desvio padrão), foi considerado um número mínimo de 45 mulheres por braço do estudo. Com 0,05 de nível de significância e poder igual a 0,80 a fim de alcançar a não-inferioridade (com $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,20$, com $p < 0,05$ como significativo). Com isto, foi proposta a inclusão de 50 mulheres por braço, levando-se em consideração 10% de desistência ao final de 180 dias de observação.

3.3. Seleção dos sujeitos

Cento e setenta e três mulheres se apresentaram no Ambulatório de Planejamento Familiar da UNICAMP, com diagnóstico de endometriose confirmado cirurgicamente (por laparoscopia ou laparotomia) ou por método de RNM de pelve ou US transvaginal e abdome total) para pesquisa de endometriose profunda. Setenta foram excluídas, sendo que 64 não preenchiam os critérios de inclusão e 6 não aceitaram participar. Com isso, 103 mulheres com diagnóstico de endometriose que apresentavam dor pélvica crônica com escore de dor maior ou igual a 4 pela escala visual analógica de dor ingressaram no estudo (Anexo 1) após receberem

ciência das informações contidas no termo de consentimento livre e esclarecido e o terem assinado (Anexo 4).

Ao serem incluídas no estudo, foram alocadas aleatoriamente, através de esquema de randomização gerado por computador com envelopes opacos e selados, em dois grupos: 51 para o SIU-LNG e 52 para o do implante de ENG.

3.4. Critérios de inclusão:

- mulheres com idade entre 18 e 45 anos;
- mulheres com diagnóstico e estadiamento cirúrgico de endometriose (segundo a ASRM, 1997) ou por método de imagem, RNM de pelve ou US transvaginal e abdome total para pesquisa de endometriose profunda (Classificação de Enzian) (12, 15);
- mulheres com dor pélvica crônica e/ou dismenorreia com escores de dor maior ou igual a 4 na escala visual analógica de dor;
- estarem dentro dos critérios de elegibilidade da Organização Mundial da Saúde para indicação de métodos contraceptivos (57);
- aceitar participar do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

3.5. Critérios de exclusão:

- Gravidez;
- Desejo atual de engravidar;
- Desejo de apenas usar o SIU-LNG ou o implante de ENG como tratamento e controle da dor devido à endometriose;
- Antecedente pessoal de má formação Mulleriana uterina ou anormalidades uterinas adquiridas, como sinéquias, ou ausência cirúrgica de útero;
- Contra-indicações ao uso do SIU-LNG (57): doença inflamatória pélvica atual ou recorrente; infecção aguda do trato genital inferior; apresentar ao exame clínico cervicite purulenta; história de aborto infectado nos últimos três meses; história de infecção puerperal nos últimos três meses; tumores malignos uterinos, cervicais, hormônios-dependentes; sangramento uterino genital de etiologia incerta ou sem diagnóstico; condições associadas ao aumento de susceptibilidade a

infecções; doenças hepáticas agudas ou tumores malignos hepáticos; tromboembolismo agudo; hipersensibilidade ao levonorgestrel;

-Contra-indicações ao uso do implante de ENG (57): tromboembolismo agudo; tumores malignos uterinos, hormônios-dependentes; sangramento uterino genital de etiologia incerta ou sem diagnóstico; doenças hepáticas agudas ou tumores malignos hepáticos; hipersensibilidade ao ENG ou a qualquer componente do implante;

-Uso abusivo de drogas ilícitas ou álcool;

-Obesidade grau III ou IMC ≥ 40 Kg/m².

3.6. Critérios de descontinuação:

-Manifestação da paciente em retirar-se do estudo por qualquer motivo;

-Perfuração uterina pelo SIU-LNG durante sua inserção;

-Desejo de retirada do SIU-LNG ou do implante de ENG antes de completar os seis meses após sua inserção;

-Piora considerável nos sintomas clínicos, relevantes do ponto de vista médico;

-Expulsão parcial ou total do SIU-LNG ou do implante de ENG;

-Diagnóstico de gravidez;

-Desenvolvimento de doença inflamatória pélvica aguda;

-Desenvolvimento de hemorragia uterina intensa durante o seguimento;

-Diagnóstico de doenças malignas (câncer) durante o estudo;

-Diagnóstico de tromboembolismo agudo durante o estudo;

3.7. Variáveis

-Variáveis independentes:

Tratamento medicamentoso recebido pela voluntária na admissão do estudo conforme randomização: SIU-LNG ou implante subdérmico liberador de ENG.

-Variáveis dependentes:

Antígeno CA-125: trata-se de uma glicoproteína de alto peso molecular encontrada em células de origem epitelial. Serve como marcador de câncer de

ovário, de outros tipos de cânceres originários no endométrio, tubas uterinas, pulmão, mama, trato gastrointestinal e também de endometriose. Classificado como normal ou aumentado, apresentando valor de referência < 35 U/ml (18) (21).

CD-23 soluvel (Cluster of differentiation): Trata-se de uma citocina que se expressa na superfície da membrana celular dos linfócitos B. A concentração das amostras foi determinada com base na curva de calibração expressa em U/ml (25) (27) (58).

Densidade de fibras nervosas em endométrio eutópico: quantificada através de imuno-histoquímica por de um marcador intracitoplasmático neuronal altamente específico capaz de reconhecer pequenas fibras nervosas. Este marcador inclui um produto de gene policlonal anti-proteína de coelho 9.5 (PGP9.5) (29,31–33).

-Dor pélvica crônica – dor pélvica referida pela participante como frequente e com duração de pelo menos seis meses e/ou que tem início próximo ou durante a menstruação; categorizada como dor pélvica crônica ou dismenorreia, ambas quantificadas em escore através da escala visual analógica de dor (54)(Anexo 4), classificada em:

0: sem dor

1 a 4: dor leve

5 a 7: dor moderada

8 a 10: dor severa

-Variáveis de controle

Idade: tempo em anos completos até a inclusão do estudo.

Cor da pele: característica declarada pela pessoa com as seguintes opções branca, preta, parda, amarela ou indígena, segundo conceito do IBGE.

Idade da menarca: caracterizada pelo início da ocorrência da primeira menstruação expressa pela participante em anos completos.

Número de partos: classificado quanto ao número de partos, seja vaginal ou cesareana; sendo, nulípara, nenhum parto; primípara, um parto; secundípara, dois partos; tercípara, três partos; e maior ou igual a quarto partos.

Número de gestações: classificado quanto ao número de vezes que a paciente ficou grávida; sendo nuligesta, nenhuma gestação; primigesta, uma

gestação; secundigesta, duas gestações; tercigesta, três gestações; multigesta, maior ou igual a quatro gestações.

Número de abortos: classificado quanto ao número de gestações terminadas antes de 20 semanas de idade gestacional ou com feto pesando menos de 500g, classificado em 0, 1, 2, mais que 3.

Índice de massa corpórea (IMC): razão entre peso e altura da paciente no momento da admissão no estudo. Peso aferido por meio de balança digital antropométrica w110H 200kg, marca Welmy®. Classificada em baixo peso <18,5 kg/m²; adequado entre 18,5-24,9 kg/m²; sobrepeso entre 25-29,9 kg/m², obesidade entre 30-39,9 kg/m², obesidade grau III acima de 40 kg/m².

Uso de medicações para dor: até um mês antes do início do estudo, referida pela participante no início do estudo, classificado como sim ou não.

Grau da endometriose avaliado através do laudo cirúrgico ou laudo de exame de imagem:

Classificado através de cirurgia de acordo com a classificação da ASRM de 1997 (12), conforme grau de invasão e acometimento de órgãos (Anexo 1):

Grau I, mínima

Grau II, leve

Grau III, moderada

Grau IV, grave

Classificado através de método de imagem específico: ressonância nuclear magnética de pelve ou ultrassonografia transvaginal e abdome total para pesquisa de endometriose profunda, conforme classificação de Enzian, em profunda ou superficial (12) (15). (Anexo 2)

Padrão de sangramento vaginal durante os últimos 90 dias avaliados. Avaliados por meio de preenchimento de calendário menstrual diário pelas participantes. O padrão de sangramento foi avaliado como descrito pela OMS(57). Amenorreia, quando não houve sangramento vaginal; sangramento infrequente, quando houve menos de 2 episódios de sangramento; sangramento regular, quando houve de 3 a 5 episódios de sangramento; sangramento frequente, quando houve mais de 5 episódios de sangramento; sangramento prolongado, quando houve mais de 14 dias de sangramento consecutivos.

3.8. Técnicas de inserção, testes e exames

-Procedimentos de inserção do SIU-LNG:

O sistema intrauterino liberador de levonorgestrel e o implante subdérmico de etonogestrel podem ser inseridos no período menstrual ou em qualquer período do ciclo na certeza de ausência de gestação (60).

O SIU-LNG tem forma de “T” com 32 mm de comprimento, radiopaco, cuja haste vertical é revestida com um cilindro de polidimetilsiloxano de 19 mm de comprimento contendo 52 mg de levonorgestrel. Disponível no Brasil com o nome de Mirena® (Bayer, Oy, Turku, Finlândia), libera 20 µg de LNG/dia tem duração aprovada de uso para 5 anos para fins contraceptivos.

-Inserção do implante de ENG

O implante subdérmico liberador de ENG, comercializado no Brasil com o nome de Implanon® (Merck Sharp & Dohme, Oss, Holanda), apresenta-se na forma de um dispositivo plástico, com 4 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro, contendo 68 mg de ENG (3-ketodesogestrel), metabólito ativo do desogestrel, envolvido em uma membrana de etileno vinil acetato. A taxa de liberação é de 60-70 µg/dia na 5ª-6ª semana e reduz a cerca de 35-45 µg/dia no final do primeiro ano; aproximadamente 30-40 µg/dia no final do segundo ano e aproximadamente 25-30 µg/dia no final do terceiro ano.

-Análises de CA-125 e CD-23 solúvel

O CA-125 e o CD-23 solúvel, foram analisados no soro. A coleta de sangue foi obtida após punção venosa, preferencialmente na prega do cotovelo, pela manhã, após jejum de 8 horas, em tubo com tampa vermelha, seco, marca Vacuette® (Greiner Bio-One, Áustria), o qual era revestido com partículas microscópicas de sílica, que ativavam o processo de coagulação. O tubo foi então deixado em repouso por 30 minutos para a retração do coágulo e a seguir submetido à centrifugação em centrífuga Excelsa 2, modelo 205N, Fanem® Ltda, indústria brasileira, a 2500 rpm por 30 minutos para a separação do soro. Após isto procedeu-se a separação do soro em três alíquotas, de 1 mililitro cada, em três tubos ciclíndricos com tampa acoplada de polipropileno para microcentrifuga (tubos de Eppendorf®). O armazenamento de mais de duas alíquotas se deu para eventual

dosagem em duplicata, caso ocorresse necessidade. As amostras foram identificadas apenas por número de registro segundo relação conforme alocação randomizada em poder da pesquisadora. Após, foram congeladas em freezer (ULT freezer, Thermo Scientific®) à -80°C no laboratório de análises clínicas do CAISM, para processamento num mesmo momento.

A determinação quantitativa de CA 125 foi realizada por imunoensaio de quimioluminescência em sanduíche, através do kit LIAISON ® CA 125 II™ (Via Crescentino SNC – 13040, Saluggia, Italy) DiaSorin. Foram usados dois anticorpos monoclonais diferentes e altamente específicos para revestimento em fase sólida e para o conjugado. Em uma primeira incubação, o CA 125 dos calibradores, nas amostras e nos controles, se liga ao anticorpo monoclonal de fase sólida e subsequentemente, após o passo da lavagem numa segunda incubação, o conjugado do anticorpo reagiu com o CA 125 que já estava ligado à fase sólida. Depois da incubação, o material não ligado foi removido mediante um ciclo de lavagem. Com isso, adicionaram-se os reagentes iniciadores que induziram uma reação de quimioluminescência. O sinal luminoso e, por conseguinte, a quantidade de conjugado anticorpo-isoluminol, foram medidos por um fotomultiplicador em unidades relativas de luz (RLU) e foi indicativo da concentração de CA125 presente nos calibradores, nas amostras e nos controles. O teste dos calibradores específicos do ensaio foram realizados para ajustar a curva mestra atribuída, efetuando duas calibrações no total. O analisador calculou as concentrações de CA-125 das amostras expressas em U/ml, o limite de referencia foi 35 U/ml (percentil 95) (60).

A dosagem do CD-23 solúvel foi realizada pelo método de enzima-imunoensaio (ELISA) eletroquimioluminimétrico, conforme instruções do fabricante, com kit comercial eBIOSCIENCE ELISA Human CD23, marca Bender MedSystem (Vienna, Austria), empregando um leitor de teste ELISA a 620 nm e espectrofotômetro com comprimento de onda primário de 450 nm para leitura de microplaca de 32 poços. Em microplaca de 32 poços (8x4), recobertos com um conjugado de peroxidase de rábano (Horseradish peroxidase - HRP) com anticorpos monoclonais murínicos anti CD-23 solúvel humano liofilizado, foram pipetados 100 µl de água destilada aos 16 poços (A1 até H2) e 50 µl da amostra, em duplicata nos poços A3 a H4. Os poços A1 a H2 receberam em duplicata padrões com concentração variando de 6,3 U/ml a 400 U/ml, diluídos na razão de 1:2 em água destilada. Após incubação à temperatura ambiente por 3 h, com agitação a 100 rpm,

os poços foram lavados três vezes com 400 µl de solução tampão de lavagem, por poço e esgotados por inversão. Essa mistura permitiu a captura do CD-23 solúvel humano pelo conjugado presente no poço, sendo o excedente retirado por lavagem. A cada poço foram acrescentados 100 µL de substrato marcado com tetrametilbenzidina, cuja ligação com o complexo acarretou, após incubação por 10 minutos, no desenvolvimento de cor azul, cuja intensidade foi avaliada em leitor ELISA a 620 nm, até que a densidade óptica do padrão mais concentrado alcançasse leitura de 0,60 a 0,65. Foram então acrescentados 100 µl de solução de bloqueio constituída por ácido fosfórico 1 M, promovendo inativação completa da HRP. A absorbância de cada poço foi lida a 450 nm em espectrofotômetro. A concentração das amostras foi determinada com base na curva de calibração de oito pontos e expressa em U/ml (painel com a média de 8 amostras randomizadas de soros de doadores saudáveis = 47 U/ml - detecção dos níveis séricos de CD23 variou de 10-91 U/ml, sendo valor indetectável <5,0 U/ml).

-Biópsias de endométrio e análises imuno-histoquímicas

As amostras foram identificadas apenas por número de registro segundo relação conforme alocação randomizada em poder da pesquisadora. A biópsia endometrial foi realizada com cureta endometrial (Pipelle de Cornier), a qual proporciona coleta de amostras teciduais consistentes, por técnica rápida e simples, dispensando dilatação cervical, minimizando o desconforto.

As reações imuno-histoquímicas para o anticorpo para PGP9,5 (PGP9.5 Polyclonal Antibody, 100ug Thermo-38- 1000 Thermo Fischer Scientific Meridian Road Rockford, Estados Unidos), foram realizadas no Laboratório de Imuno-histoquímica (Departamento de Anatomia Patológica/UNICAMP) em todos os casos. Os espécimes foram fixados imediatamente após a coleta em solução tamponada de formol a 10%. Foram processadas e emblocadas em parafina e submetidos a cortes histológicos de 4 micrômetros de espessura, os quais foram alocados em lâminas silanizadas, depois desparafinizadas com três banhos de xilol à temperatura ambiente. Após, as lâminas foram banhadas em três álcoois absolutos, um álcool 80% e um álcool a 50% para hidratação progressiva, lavagens de 30 segundos cada, seguidas de lavagem em água corrente e destilada por mais três minutos. Para a inibição da peroxidase endógena, foram incubadas em banhos de cinco minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio à temperatura

ambiente, seguidas novamente de lavagem em água corrente e destilada por mais 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com imersão das lâminas em tampão Tris-EDTA 0,05M pH8,9, durante 30 minutos, a cerca de 95°C, com esfriamento subsequente por 15 minutos para o anticorpo para PGP9.5 na diluição 1:1400(29,32). Após, foram lavadas em água corrente e destilada. O anticorpo primário foi gotejado sobre os respectivos preparados histológicos nas diluições supracitadas e as lâminas incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Após, incubadas por 16 a 20 horas (overnight) a 4°C em câmara úmida.

Posteriormente, foram lavadas três vezes em solução tampão PBS (phosphate buffer saline), pH 7,4, à temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas por uma hora a 37°C com um coquetel de polímeros marcado com peroxidase, sendo utilizado, o sistema de detecção Advance (DAKO, Califórnia, Estados Unidos), e, após, novamente imersas em PBS. A coloração foi realizada com Kit DAB (diamino-benzidina) - Dako REF - 3468 – cromógeno marrom por 5 minutos a 37°C. O material foi lavado em água corrente, contra-corado com hematoxilina de Mayer, desidratado (três banhos de álcool etílico e três de xilol) e as lamínulas coladas com resina de Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) Além dos casos do grupo de estudo, para controle das reações imuno-histoquímicas para anticorpo para PGP9.5, foram selecionados cortes histológicos de fibras nervosas, para os quais é considerada a positividade de reação se houver expressão difusa deste marcador. Seguido à coloração pela imuno-histoquímica, procedeu-se a contagem das fibras nervosas. Inicialmente a avaliação foi realizada utilizando microscópio Nikon Eclipse E200®, a fim de se identificar áreas com maior concentração de densidade de fibras nervosas abaixo da camada basal do epitélio endometrial. Foram excluídas amostras contendo apenas muco ou hemácias. Após, selecionadas imagens com grande aumento, foram fotografados em cada lâmina da reação imuno-histoquímica de PGP 9.5, entre 1 a 10 campos, com programa de captura de imagem Cell Sens Standart, câmera Olympus DP72, com 13 mega Pixels, em arquivo TIFF, com a menor quantidade de artefatos técnicos, cada um contendo o maior numero de fibras nervosas no estroma endometrial por campo. As fibras nervosas foram contadas individualmente por campo de grande aumento (400x). O escore (densidade) de cada participante foi dado pela média do número de fibras nervosas dividido pelo número de campos contados.

As amostras de sangue e as biópsias endometriais foram armazenadas em laboratório adequado da UNICAMP (biorrepositório).

3.9. Acompanhamento dos sujeitos

O acompanhamento das participantes se deu do mês de outubro de 2016 à outubro de 2017, mensalmente. A sequência de randomização foi gerada por computador com envelopes opacos e selados.

Após alocada, cada participante informou o número correspondente à intensidade da dor pélvica e dismenorreia, através do emprego da escala visual analógica de dor de 10 pontos, indicado o ponto na escala em que melhor representou sua dor naquele momento (Anexo 4).

A depender do tipo de tratamento, foi encaminhada para colocação do SIU-LNG ou implante de ENG. As coletas de amostras sanguíneas bem como as biópsias endometriais foram realizadas antes da intervenção e após 180 dias, no Ambulatório de Planejamento Familiar da UNICAMP. As primeiras, foram armazenadas em freezer a -80°C no laboratório de análises clínicas do CAISM, as segundas no laboratório de imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica da FCM- UNICAMP e mantidas em formol tamponado a 10%.

Após o término do estudo, as pacientes tiveram seu tratamento e seguimento assegurado no Ambulatório de Planejamento Familiar da UNICAMP. Ficou também assegurado a todas as participantes que ao final do estudo, possuam acesso gratuito e por tempo indeterminado, ao melhor método terapêutico (caso comprovado benefício) tão logo a sua participação individual no estudo tenha terminado e pelo tempo que lhe for benéfico. Se por qualquer eventualidade, alguma participante expressava desejo em sair do estudo, não houve qualquer tipo de penalização ou prejuízo em seu atendimento. Se alguma participante evoluísse com piora da dor durante o seguimento da pesquisa, esta foi encaminhada ao ambulatório de endometriose para avaliar necessidade de abordagem cirúrgica. As participantes, caso o desejarem, puderam continuar o uso do método alocado. O implante de ENG pode ser usado por um período de 3 a 5 anos; e o SIU-LNG, por 5 a 7 anos.

Para a descrição deste protocolo foi seguido um conjunto mínimo de recomendações para reportar ensaios clínicos randomizados, o CONSORT

(Consolidated Standards of Reporting Trials) e registrado no Clinicaltrials.gov com o número NCT 02480647.

3.10. Análise Estatística

Os dados (Anexo 5) foram repassados para o banco de dados por dois digitadores diferentes, para que pudesse ser evitado perda de dados ou erro de digitação.

Os dados coletados foram digitados em planilha eletrônica do programa Numbers® para Apple® (Apple Inc© Corporation, Cupertino, Califórnia, Estados Unidos da América). A análise estatística foi utilizado o programa computacional The SAS System for Windows (Statistical Analysis System©), versão 9.2 (SAS, Institute Inc, 2002-2008, Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos da América).

As análises de eficácia foram realizadas por Intensão de Tratar (Intention to treat), incluindo todas as mulheres que tiveram pelo menos uma avaliação de eficácia.

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (grupo, cor, ...), com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas (idade, marcadores, ...), com valores de média, desvio padrão e intervalo de 95% de confiança.

Para comparação das variáveis categóricas entre os 2 grupos foram utilizados os testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher (para valores esperados menores que 5). Para comparação das variáveis numéricas entre os 2 grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, devido à ausência de distribuição normal das variáveis.

Para comparação das variáveis numéricas entre antes e após o tratamento foi usado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas, devido à ausência de distribuição normal das variáveis. Para comparar as variáveis numéricas entre os 2 grupos e as 2 avaliações simultaneamente foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas, seguida dos testes de Tukey (comparações intergrupos) e de perfil por contrastes (comparações intragrupos). As variáveis sem distribuição normal foram transformadas em postos/ranks.

Para a correlação entre as variáveis numéricas na amostra total e por grupo, em cada avaliação (inicial e final) foi usado o coeficiente de correlação de Spearman.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS



Deborah margatho ramos gonçalves <debmarginho@gmail.com>

Fertility and Sterility - Submission Confirmation

Fertil Steril <eesserver@eesmail.elsevier.com>

26 de junho de 2018 14:27

Responder a: Fertil Steril <Fertstert@asrm.org>

Para: bahamond@caism.unicamp.br, drluisbahamondes@hotmail.com

Cc: debmarginho@gmail.com, carvalho.nelsi@gmail.com, larissa_ely@yahoo.com.br

Dear Dr. Bahamondes,

Your submission entitled "Assessment of biomarkers among women with endometriosis-associated pain who use etonogestrel-releasing contraceptive implant or 52-mg levonorgestrel-releasing intrauterine system: a randomized clinical trial." has been received by Fertility and Sterility.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System of Fertility and Sterility as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/fns/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Fertility and Sterility Editorial Office



Deborah margatho ramos gonçalves <debmarginho@gmail.com>

Track your recent Co-Authored submission to FNS

Fertil Steril <eesserver@eesmail.elsevier.com>

26 de junho de 2018 14:27

Responder a: Fertil Steril <Fertstert@asrm.org>

Para: debmarginho@gmail.com

Dear Dr. Deborah Marghato,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Fertility and Sterility

Title: Assessment of biomarkers among women with endometriosis-associated pain who use etonogestrel-releasing contraceptive implant or 52-mg levonorgestrel-releasing intrauterine system: a randomized clinical trial.

Corresponding Author: Luis Bahamondes

Co-Authors: Deborah Marghato, MD; Nelsilene Carvalho, MD; PhD; Larissa Eloy, PhD

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/fns/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Deborah&lname=Marghato&email=debmarginho@gmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/fns/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=debmarginho@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at bahamond@caism.unicamp.br; drluisbahamondes@hotmail.com.

Thank you,

Fertility and Sterility

June 26, 2018

Antonio Pellicer, M.D.
Craig Niederberger, M.D.
Co-Editors-in-Chief
Fertility and Sterility

Dear Drs Pellicer and Niederberger

Please find enclosed our manuscript entitled “Assessment of biomarkers among women with endometriosis-associated pain who use etonogestrel-releasing contraceptive implant or 52-mg levonorgestrel-releasing intrauterine system: a randomized clinical trial.” which we would like to submit to Fertility and Sterility.

We certify that the manuscript was not submitted to other journal.

Yours sincerely

Professor Dr. Luis Bahamondes

Fertility and Sterility®

STATEMENT OF AUTHORSHIP

Each author is required to submit a signed Statement of Authorship upon submission. This applies to all submission types including Editorials, Letters to the Editor, etc.

Date: June 26, 2018

Manuscript # (if available): _____

Manuscript title: Assessment of biomarkers among women with endometriosis-associated pain who use etonogestrel-releasing contraceptive implant or 52-mg levonor a randomized clinical trial

Corresponding author: Luis Bahamondes

Authors may either sign the same form or submit individually

I am an author on this submission, have adhered to all editorial policies for submission as described in the Information for Authors, attest to having met all authorship criteria, and disclosed all potential conflicts of interest for inclusion on the title page of the submission.

Signatures are required - typed signatures are unacceptable.

Typed or CLEARLY Printed Name: Deborah Margatho

Signature: Deborah Margatho

Typed or CLEARLY Printed Name: Nelsilene Carvalho

Signature: Nelsilene Carvalho

Typed or CLEARLY Printed Name: Larissa Eloy

Signature: Larissa Eloy

Typed or CLEARLY Printed Name: Luis Bahamondes

Signature: Luis Bahamondes

Typed or CLEARLY Printed Name:

Signature: _____

Typed or CLEARLY Printed Name:

Signature: _____

Typed or CLEARLY Printed Name:

Signature: _____

Typed or CLEARLY Printed Name:

Signature: _____

Assessment of biomarkers among women with endometriosis-associated pain who use etonogestrel-releasing contraceptive implant or 52-mg levonorgestrel-releasing intrauterine system: a randomized clinical trial.

Deborah Margatho, MD ^a

Nelsilene Carvalho, MD; Ph.D^a

Larissa Eloy, Ph.D^b

Luis Bahamondes, MD; Ph.D^{*a}

^a Department of Obstetrics and Gynecology, and ^b Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Running title: Biomarkers in women with endometriosis-associated pain

Funding: This study received partial financial support from the *São Paulo Research Council* (FAPESP) awards #2015/20504-9 and 2015/10021 and from the Brazilian National Research Council (CNPq), grant #573747/2008-3. Merck also provided funds for the study under unrestricted grant # 37228. The International Contraceptive Access Foundation, Turku, Finland under an unrestricted grant, donated the LNG-IUSs used in this study. The donors do not have any participation on the elaboration of the protocol, conducting the study, analyzing the data or writing the manuscript.

***Corresponding author:**

Dr. Luis Bahamondes; Department of Obstetrics and Gynecology

University of Campinas Faculty of Medical Sciences

Caixa Postal 6181; 13084-971, Campinas, SP; Brazil

Tel: +55-19-3289-2856; Fax: +55-19-3289-2440;

E-mail: bahamond@caism.unicamp.br

Capsule: Serum CD23 and endometrial nerve fiber density were significantly reduced in women with endometriosis-associated pain after 6 months of using either an ENG-implant or a levonorgestrel-releasing intrauterine system.

Abstract

Objective: To assess serum levels of the biomarkers CA 125, CD23, and endometrial nerve fiber density in women with endometriosis-associated pelvic pain before and after 6 months of using the etonogestrel (ENG)- contraceptive implant or the 52-mg levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS).

Design: Randomized clinical trial in which the women were assigned to use an ENG- implant or an LNG-IUS.

Setting: University teaching hospital.

Patients: A total of 103 women with endometriosis-associated pain diagnosed by surgery, transvaginal ultrasound, and/or magnetic resonance imaging.

Intervention(s): The ENG-implant or LNG-IUS was placed within the first 5 days of the menstrual cycle.

Main Outcome Measure(s): Serum levels of CA 125, CD23 soluble, and endometrial nerve fiber density were assessed before insertion and after 6 months of using the devices and were correlated to 10 cm visual analogue scale (VAS) non-cyclic pelvic pain and dysmenorrhea scores.

Results: Both contraceptives reduced the concentrations of serum CD23 soluble levels and endometrial nerve fiber density ($P < .001$); however, CA 125 was only significantly reduced among users of the ENG-implant ($P < .05$). No correlation was observed between reduction of biomarkers and improving on VAS pain and dysmenorrhea scores. No differences were observed between the ENG-implant and the LNG-IUS.

Conclusion: Both progestin-only contraceptives significantly reduced 2 out of the 3 biomarkers evaluated, and these can be used as surrogate markers to follow-up medical treatment of endometriosis-associated pain.

Keywords: Endometriosis, biomarkers, etonogestrel-implant; levonorgestrel-releasing intrauterine system; CA 125, CD23, endometrial nerve fibers.

Clinical trial registration: Clinicaltrials.gov under number NCT 02480647.

Introduction

The current gold standard for diagnosing endometriosis is through surgical means, either by laparoscopy or laparotomy with biopsy of the lesions (1,2). For women with deep endometriosis, image-based diagnosis using magnetic resonance imaging (MRI) and/or ultrasonography (US) has also been recently introduced (3). Due to the fact that surgery is an invasive diagnostic tool, several biomarkers have recently been proposed as non-invasive diagnosis tools for endometriosis (2,4,5); however, none of the biomarkers proposed thus far have a high enough sensitivity and specificity to properly diagnosis endometriosis (6).

The most investigated biomarker is the cancer antigen CA 125, a well-established biomarker for ovarian cancer (7, 8). CA 125 is a glycoprotein and is increased in endometriosis by stimulation of the celomic epithelium. Unfortunately, CA 125 is not useful for diagnosing endometriosis as a single test (2). Another biomarker studied is serum CD23 soluble, which exists both in membrane cells and in the soluble form. The cytokines are activated through the inflammatory response to the endometriotic implant, which may activate B cells and increase CD23 soluble levels. These were significantly decreased during treatment in women with endometriosis (9). Furthermore, it has been suggested that aberrant molecular expression and increased invasion associated with the nerve fibers in the eutopic endometrium could serve as biomarkers for the disease (5).

The goal of clinical treatment for endometriosis is to reduce the local inflammation associated with the disease and consequent pain. Medical treatments for endometriosis could be indicated alone or complementary to surgery (2,10). In this regard, progestin-only (p-only) compounds have been described as effective and inexpensive treatments for endometriosis (2). These options have few side effects, and some of them are long-acting contraceptive methods in which a stable serum hormone level is maintained during use. This kind of hormone release may also contribute to neuromodulation of pain and perception, which could be beneficial for women with endometriosis (11). The etonogestrel (ENG) contraceptive implant and the 52-mg levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) have been used by women with endometriosis-associated pain with positive results (12–14), albeit the use of the ENG-implant is more restricted.

Due to the scarce information about the effects of using the ENG-implant and the LNG-IUS on certain biomarkers, the objectives of our study were to assess serum CA 125 and CD23 soluble levels and endometrial fiber nerve density in two groups of women with endometriosis-associated pain. The groups were given either the ENG-implant or the LNG-IUS, and they were assessed before and up to 6 months after device placement.

Materials and Methods

Study design

This was an open-label, parallel, randomized clinical trial with 1:1 allocation ratio of the ENG implant and the LNG IUS. The study was conducted at the Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, SP, Brazil. Ethical approval was granted from the Ethical Committee of the University of Campinas. Written informed consent was signed from all participants prior to their admission into the study. Recruitment was performed from June 2016 to October 2017. The trial was registered as Clinicaltrials.gov under number NCT 02480647.

Patients

Admission criteria included a surgically and histologically confirmed diagnosis of stage I to IV endometriosis according to the Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis (1) or women with a diagnosis of deep endometriosis according to transvaginal ultrasonography and MRI based on the Enzian classification (3,15,16). All of the participants had endometriosis-associated pain, such as non-cyclic pelvic pain and/or dysmenorrhea with a score ≥ 4 based on the 10-cm visual analogue scale (VAS) (17). Furthermore, inclusion criteria were patients who were not pregnant, had no desire to conceive within the next 12 months, were aged ≥ 18 and ≤ 45 years, and were willing to be randomly assigned to the use of an ENG-implant or an LNG-IUS. Exclusion criteria for use of the ENG implant or the LNG IUS were those established by the World Health Organization (18). Another exclusion criteria were women who had undergone surgical treatment for endometriosis in the 2 months prior to enrollment in the study or the use of any hormonal treatment during the study period. ENG-implants or LNG-IUS were placed within the first 5 days of the menstrual cycle. Follow-up visits were monthly for up to 6 months post-insertion or until removal or expulsion of the implant/LNG IUS, whichever occurred first.

Treatments

Women were randomized (1:1) to receive either the ENG-releasing contraceptive implant (Implanon NXT®; Merck, Oss, The Netherlands) or the 52-mg LNG-IUS (Mirena®; Bayer Oy, Turku, Finland). The participating women were allowed to keep the ENG-implant or the LNG-IUS after completion of the study, and they are being followed up to 3 years after study initiation.

Randomization

A total of 103 women were randomly assigned (1:1) using a computer program of sealed envelopes and a permuted block size of 6 to receive either the ENG-implant (n = 52) or the LNG-IUS (n = 51). The participants only knew which treatment was to be used after signing the informed consent form. The envelope was opened in front of the participant before device placement.

Procedures

A baseline VAS pain and dysmenorrhea score of at least 4 was required for inclusion in the study. VAS is a subjective evaluation of pain in a linear format, in which 0 represents no pain, 1–3 is mild pain, 4–7 is moderate pain, and 8–10 is severe pain (10 being the worst pain possible). The participants had to mark a point somewhere along a 10 cm line prior to intervention and again up to 6 months after (17).

Serum samples were collected for each participant for evaluation of CA 125 and CD23 soluble, and an endometrial biopsy with Pipelle de Cornier (CopperSurgical, Trumbull, CT, USA) was performed before admission in the study and at 180 days after device placement. Because CA 125 could be temporarily increased during menstruation and in endometriosis foci, we assessed bleeding patterns during the second 90-day reference period. A menstrual calendar was provided to all participants. Data was analyzed in the second 90-day reference period and patterns were classified as amenorrhea (no bleeding), infrequent bleeding (1–2 episodes of bleeding and/or spotting), regular bleeding (3–5 episodes of bleeding and/or spotting), frequent bleeding (> 5 episodes of bleeding and/or spotting), prolonged bleeding (> 14 consecutive days of bleeding and spotting), or prolonged spotting (> 14 consecutive days of spotting alone) (19).

Serum analyses

Quantitative determination of CA 125 was performed by sandwich chemiluminescence immunoassay using the LIAISON® CA 125 II™ kit (DiaSorin, Saluggia, Italy). Two different, highly specific monoclonal antibodies were used for solid phase and conjugate coating. The analyzer calculated the CA-125 concentrations of samples and the reference limit was 35 U/mL (percentile 95). Soluble CD23 assay was analyzed by the electrochemoluminimetric enzyme immunoassay method according to the manufacturer's instructions using a commercial kit, EBIOSCIENCE ELISA Human CD23 (Bender MedSystem, Vienna, Austria). A 620 nm ELISA test reader and spectrophotometer with primary wavelength of 450 nm were employed for 32-well microplate reading. The

concentration of the samples was determined based on the calibration curve of 8 points and expressed in U/mL. A panel with the mean of 8 randomized samples from healthy donors = 47 U/mL; detection of serum CD23 levels ranged from 10–91 U/mL and were undetectable at < 5.0 U/mL.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical reactions for the antibody to PGP9.5 (PGP9.5 Polyclonal Antibody, 100ug Thermo-38-1000 (Road Rockford, United States) were performed at the Department of Pathology/UNICAMP in all cases. The specimens were fixed immediately after collection in 10% formalin buffered solution. They were processed and embedded in paraffin and subjected to histological sections of 4 µm thickness, which were allocated on silanized slides, then deparaffinized with three xylol baths at room temperature. Afterwards, the slides were bathed in 3 absolute alcohols, an 80% alcohol, and a 50% alcohol for progressive hydration; washings lasted 30 seconds each, followed by washing under running water and distillation for another 3 min.

For the inhibition of the endogenous peroxidase, specimens were incubated in baths for 5 min in a hydrogen peroxide solution at room temperature, followed again by washing in running water, and then distilled for another 5 min. Antigen retrieval was performed by immersing the slides in 0.05 M Tris-EDTA buffer pH 8.9 for 30 min at about 95°C, with subsequent cooling for 15 min for the PGP 9.5 antibody at the 1:1400 dilution (20,21). Afterward, they were washed in distilled water.

The primary antibody was dripped onto the respective histological preparations at the abovementioned dilutions, and the slides were incubated in an oven at 37°C for 30 min. After that, they were incubated for 16 to 20 hours (overnight) at 4°C in a humid camera. Subsequently, they were washed 3 times in a phosphate buffer saline (pH 7.4) at room temperature. The slides were then incubated for 1 hour at 37°C with a peroxidase-labeled polymer cocktail using the Dako Advance detection system (Dako, California, USA), and then immersed in PBS again.

The staining was performed with a diaminobenzidine (DAB; Dako REF 3468, California, USA) kit brown chromogen for 5 min at 37°C. The material was washed in running water, counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated (3 ethyl alcohol and 3 xylol baths), and the coverslips bonded with Entellan® resin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

In addition to the cases for the control of the immunohistochemical reactions for PGP 9.5 antibody (22,23), histological sections of nerve fibers were selected, and reaction positivity was considered if there was diffuse expression of this marker. Following staining by immunohistochemistry, the nerve fibers were counted. Initially, the evaluation was performed using a Nikon Eclipse E200® microscope (Tokyo, Japan) in order to identify areas with higher concentrations of nerve fiber density below the basal layer of the endometrial epithelium. Samples containing only mucus or red blood cells were excluded. After the high magnification images were selected, the cells were photographed on each slide of the immunohistochemical reaction of PGP 9.5 between 1 and 10 fields using the image capture program cellSens Standard and Olympus DP72 camera with 13 MPa and TIFF file format (Miami, FL, USA). The least amount of technical artifacts were used, and each contained the largest number of fiber nerve density in the endometrial stroma per field. Fiber nerve density was counted individually by high magnification field (400x). The score (density) of each participant was given by the mean number of fiber nerve density divided by the number of counted fields.

Outcomes

The primary outcome was changes in CA 125 serum, CD23 soluble serum, fiber nerve density and the second outcome was a correlation between the reduction of biomarkers and the improvement of VAS non-cyclic pain and dysmenorrhea scores at the end of treatment.

Statistical analysis

The ENG-implant was the experimental treatment in this study, and the LNG-IUS was the active comparator. The sample size was calculated based on the non-inferiority hypothesis of ENG-implant with respect to LNG-IUS. Several non-inferiority studies using VAS to measure pain have used a non-inferiority margin of 1.5 cm (17). A 1.5-cm non-inferiority margin was considered with a standard deviation (SD) of 2.5 cm. A minimum sample size of 45 women per study arm was needed at 0.05 significance level and power equal to 0.80 to achieve non-inferiority. Taking into account 10% of dropouts, 50 women had to be included per study arm. The analyses were performed as an intention-to-treat (ITT) study, including all randomized women that had at least 1 efficacy evaluation. The socio-demographic profile of the sample was described with absolute frequency and percentage values. Descriptive statistics of the numerical variables were described with mean values, standard deviation, and 95% confidence interval.

For comparison of the categorical variables between the 2 groups, the Chi-Square or Fisher's exact tests were used (for expected values less than 5). The Mann-Whitney test was used to compare the numerical variables between the 2 groups due to the absence of normal distribution of the variables. The Wilcoxon test for related samples was used to compare numerical variables between pre- and post-treatment due to the absence of normal distribution of the variables. To compare the numerical variables between the 2 groups and the 2 evaluations simultaneously, the analysis of variance for repeated measurements was used, followed by the Tukey Test (intergroup comparisons) and the contrasts profile (intragroup comparisons). The variables without normal distribution were transformed into stations/ranks. For the correlation between the numerical variables in the total sample and per group, the Spearman correlation coefficient was used for each evaluation (initial and final). The significance level adopted was 5%. SAS/STAT software program version 9.4 was used.

Results

A total of 103 women were randomly grouped; 52 women were allocated to receive the ENG-implant and 51 women were allocated to receive the LNG-IUS. No adverse events occurred during insertion of the ENG implant or the LNG IUS. A flowchart of the participants for this study is shown in Figure 1. Table 1 displays the participants' socio-demographic characteristics and shows that women from both groups were similar in all variables. Almost 50% of the women were between the ages of 30 and 39 years, and the mean (\pm SD) body mass index (kg/m^2) was $27.4 \pm 5.2 \text{ kg/m}^2$.

The quality of endometrial biopsy fragments for immunohistochemical analysis was classified as satisfactory and non-satisfactory, characterized by the presence of mucus and absence of endometrial cells the latter. In the ENG group, at baseline, biopsies were 3.8% non-satisfactory and 96.2% satisfactory for analysis. In the LNG-IUS group, 15.7% of biopsies were non-satisfactory, and 84.3% were satisfactory for analyses at baseline. However, after up to 180 days of observation, 20% of the biopsies were non-satisfactory and 80% satisfactory for analysis in both groups.

Among users of the ENG-implant, the serum levels of CA 125, CD23 soluble, and the nerve fiber density were significantly reduced. CA 125 fell from $45.4 (\pm 63.8) \text{ U/mL}$ to $26.7 (\pm 41.6) \text{ U/mL}$ from baseline to 180 days of evaluation ($P < .001$). In addition, serum levels of CD23 soluble also fell from $59.6 (\pm 124.2) \text{ U/mL}$ to $6.5 (\pm 13.2) \text{ U/mL}$ from baseline to 180 days of evaluation ($P < .001$). There was also a reduction in endometrial nerve fiber density

from $6.7 (\pm 8.4)$ per mm^2 to $2.7 (\pm 4.1)$ per mm^2 from baseline to 180 days of evaluation ($P < .001$).

Regarding users of the LNG-IUS, there was a significant reduction in the serum CD23 soluble and nerve fiber density. However, although CA 125 fell, the value was not significant, with a baseline of $25.5 (\pm 31.1)$ U/mL to $22.7 (\pm 30.4)$ U/mL at 180 days of evaluation ($P = .142$). The reduction of the CA 125, CD23 soluble, and nerve fiber density at 180 days after device placement did not correlate with the reduction of VAS non-cyclic pelvic pain and dysmenorrhea scores (Table 2; Figure 2).

For the majority of ENG-implant users, the bleeding patterns were amenorrhea (29%) and infrequent bleeding (24%) at 180 days of follow-up. Furthermore, 53% of amenorrhea and less than 2 episodes of bleeding were observed in the last 90 days. For LNG-IUS users, infrequent bleeding was observed in 30.0% and amenorrhea in 7.5% at 180 days of follow up. It was observed that 37.5% of amenorrhea and less than 2 episodes of bleeding occurred in the last 90 days in this group.

Discussion

These results showed that both the LNG IUS and ENG implant significantly reduced serum levels of CD23 soluble and nerve fiber density. In addition, the biomarker CA 125 was also significantly reduced among ENG-implant users.

Infertility and pain are the two main complaints of women who suffer from endometriosis. It is speculated that the monthly repeated tissue injury caused by reflux of menses to the pelvis explains increases in the local inflammatory response, and may also explain epigenetic changes, culminating in the onset of the disease and its progression to invasion (24,25).

Despite these advances in understanding, the pain mechanism is still poorly explained. Although current hypotheses may clarify more severe cases of endometriosis and distortion of the pelvic anatomy causing painful disorders, they do not explain painful symptoms in women with minimal endometriosis.

The introduction of several biomarkers was an interesting issue in the diagnosis and management of different treatments for women with endometriosis. However, this study did not find a reduction in CA 125 serum levels among users of the LNG-IUS, which is contrary to previous results (24,25). Although CA 125 has low sensitivity and specificity, it is still one of the most common biomarkers for managing women with endometriosis (4,7,26,28). Nevertheless, a reduction of CA 125 serum levels up to 180 days after ENG-implant

placement was observed. In the ENG-implant group, the percentage of patients with less than 2 episodes of bleeding in the last 90 days (amenorrhea and infrequent bleeding) was 53%. This may be associated with reduction in uterine blood flow and reflow, likely in the endometriotic foci (29,30). However, in the LNG-IUS group, in which there was no significant reduction in CA 125, only 37.5% of the participants presented amenorrhea or infrequent bleeding in the last 90 days of observation.

In addition, it was observed that baseline soluble CD23 levels were significantly elevated when compared to women without endometriosis. These values decreased significantly 180 days post device placement for both groups, suggesting that ovarian function influences immune response through modulation of B cell activation, as previously indicated (9,20).

Furthermore, our findings confirmed previous results that endometrial nerve fiber density was higher in women with endometriosis (22–24,31), and the density was significantly reduced after 6 months of use for both contraceptives (32,33). These findings suggest that nerve fiber density could be used as an indirect diagnostic tool or less invasive surrogate marker (31,34). Progesterone may inhibit the expression of estrogen and progesterone receptors on the endometrial surface, reducing inflammatory activity and nerve fiber density. The stimulus of regulation of neurotrophins and other molecules associated with the increase in endometrial nerve fibers justifies the improvement of pelvic pain through reduction of these fibers.

Our study is limited because it has been described that endometrial specimens from women with pelvic pain and uterine fibroids increased the immunoreactivity of the nerve fibers stained by PGP 9.5, which indicated that the increase of the nerve fibers in the endometrium may not be specific to women who suffer endometriosis-associated pain (35). Another limitation is that the three biomarkers are surrogate markers and possibly cannot be used. However, the strength of our study is that the women who received two p-only contraceptives reduced these biomarkers and also presented with reductions in VAS pain and dysmenorrhea scores.

Although both contraceptives tested in our study improved VAS non-cyclic pelvic pain and dysmenorrhea scores and were associated with a reduction in the 3 biomarkers assessed, it is still unknown what the exact mechanism of action is for ENG-implant and LNG-IUS in endometriosis. It can be speculated that the effect could be local or systemic or could modulate the endocrine and local endometrial immune system. This could reduce the estrogenic activity and the stimulus of regulation of neurotrophins and other molecules

associated with increased endometrial nerve fibers, justifying the improvement in pelvic pain (36).

In conclusion, our results showed that women with endometriosis-associated pain may equally benefit from the use of the ENG-implant and the 52-mg LNG-IUS because these provoked reductions in nerve fiber density in the endometrium, decreases in CA 125 and CD23 biomarkers, and pain improvement, although with weak correlation. The most recent ESHRE 2015 guidelines did not recommended the use of any biomarkers to diagnose endometriosis (2). However, the biomarkers used in this study could be a complementary tool as a noninvasive diagnostic method for asymptomatic women, suspected endometriosis in adolescents, and suspected endometriosis in infertile women without the occurrence of pain. In addition, biomarkers are a good strategy for monitoring women undergoing treatment (4,37).

Trial Registration: The trial was registered as Clinicaltrials.gov under number NCT 02480647

Funding: This study received partial financial support from the *São Paulo Research Council* (FAPESP) awards #2015/20504-9 and 2015/10021 and from the Brazilian National Research Council (CNPq), grant #573747/2008-3. Merck also provided funds for the study under unrestricted grant # 37228. The International Contraceptive Access Foundation, Turku, Finland under an unrestricted grant, donated the LNG-IUSs used in this study. The donors do not have any participation on the elaboration of the protocol, conducting the study, analyzing the data or writing the manuscript.

Competing interests: We declare that we have no conflicts of interest regarding this study. LB received honorarium to be member of advisory board and has been an invited speaker at scientific meetings for Bayer Healthcare Pharmaceuticals and Merck. Also, he is a member of the ICA Foundation without remuneration. The other authors declare no conflicts of interest.

References

1. ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817–21.
2. Dunselman GAJ, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D’Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2014;29:400-12.
3. Haas D, Shebl O, Shamiyeh A, Oppelt P. The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: Their strengths and weaknesses. *Acta Obstet. Gynecol Scand* 2013;92:3-7.
4. Gupta D, Hull ML, Fraser I, Miller L, Bossuyt PMM, Johnson N, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;2016(4) CD012165.
5. Ahn SH, Singh V, Tayade C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertil Steril* 2017;107:523–32.
6. Fassbender A, Burney RO, O DF, D’Hooghe T, Giudice L. Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *Biomed Res Int* 2015;2015:130854.
7. Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Ferriani RA. Serum CA-125 in the diagnosis of endometriosis. *Int J Gynecol Obstet* 2007;96:206-7.
8. Hirsch M, Duffy J, Davis C, Plana MN, Khan K. Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 for endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2016;123:1761–8.
9. Odukoya O-A, Bansal A, Wilson P, Kxim, Weetman AP, Cooke ID. Soluble CD23 protein in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11:2018–21.
10. Practice T, Medicine R. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: A committee opinion. *Fertil Steril* 2014;101:927–35.
11. Máximo MM, Silva PS, Vieira CS, Gonçalves TM, Rosa-E-Silva JC, Candido-Dos-Reis FJ, et al. Low-dose progestin-releasing contraceptives are associated with a higher pain threshold in healthy women. *Fertil Steril* 2015;104:1182-9.
12. Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podgaec S, et al. Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:1993-8.

13. Vercellini P, Aimi G, Panazza S, De Giorgi O, Pesole A, Crosignani PG. A levonorgestrel-releasing intrauterine system for the treatment of dysmenorrhea associated with endometriosis: A pilot study. *Fertil Steril* 1999;72:505-8.
14. Walch K, Unfried G, Huber J, Kurz C, van Trotsenburg M, Pernicka E, et al. Implanon® versus medroxyprogesterone acetate: effects on pain scores in patients with symptomatic endometriosis - a pilot study. *Contraception* 2009;79:29-34.
15. Guerriero S, Condous G, van den Bosch T, Valentin L, Leone FPG, Van Schoubroeck D, et al. Systematic approach to sonographic evaluation of the pelvis in women with suspected endometriosis, including terms, definitions and measurements: a consensus opinion from the International Deep Endometriosis Analysis (IDEA) group. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;48:318-32.
16. Johnson NP, Hummelshoj L, Adamson GD, Keckstein J, Taylor HS, Abrao MS, et al. World endometriosis society consensus on the classification of endometriosis. *Hum Reprod* 2017;32:315-24.
17. Gerlinger C, Schumacher U, Faustmann T, Colligs A, Schmitz H, Seitz C. Defining a minimal clinically important difference for endometriosis-associated pelvic pain measured on a visual analog scale: Analyses of two placebo-controlled, randomized trials. *Health Qual Life Outcomes* 2010;8:138.
18. WHO. Medical Eligibility criteria for Contraceptive Use. 2015;1-276. Available from: www.who.int/reproductive health. Accessed June 23, 2018.
19. Belsey EM, Machin D, D'Arcangues C. The analysis of vaginal bleeding patterns induced by fertility regulating methods. World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. *Contraception* 1986;34:253-60.
20. Odukoya O, Bansal A, Cooke I. Serum endometrial IgG antibodies and soluble CD23 concentrations in patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:927-31.
21. Matalliotakis IM, Neonaki MA, Koumantaki YG, Goumenou AG, Kyriakou DS, Koumantakis EE. A randomized comparison of danazol and leuprolide acetate suppression of serum-soluble CD23 levels in endometriosis. *Obstet Gynecol* 2000;95:810-3.
22. Newman TA, Bailey JL, Stocker LJ, Woo YL, MacKlon NS, Cheong YC. Expression of

- neuronal markers in the endometrium of women with and those without endometriosis. *Hum Reprod* 2013;28:2502-10.
23. Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe GM, Markham R, et al. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: A double blind study. *Hum Reprod* 2009;24:3019-24.
 24. Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertil. Steril* 2017;108:872-85.
 25. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* 2012;98:564-71.
 26. de Sá Rosa e Silva ACJ, Rosa e Silva JC, Nogueira AA, Petta CA, Abrão MS, Ferriani RA. The levonorgestrel-releasing intrauterine device reduces CA-125 serum levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2006;86:742-4.
 27. Yucel N, Baskent E, Karamustafaoglu Balci B, Goynumer G. The levonorgestrel-releasing intrauterine system is associated with a reduction in dysmenorrhoea and dyspareunia, a decrease in CA 125 levels, and an increase in quality of life in women with suspected endometriosis. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol* 2018; In press.
 28. Mol BWJ, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MAHM, Bongers MY, Van Der Veen F, et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: A meta-analysis. *Fertil Steril* 1998;70:1101-8.
 29. Niloff, J M; Knapp, R C; Schaetzi, E; Reynolds, C; Bast RCJ. CA 125 antigen levels in obstetric and gynecologic patients. *Obs Gynecol* 1984;64:703-7.
 30. Masahashi, T; Matsuzawa, K; Narita, O; Asai, T; Ishihara M. Serum CA-125 levels in patients with endometriosis: changes in CA-125 levels during menstruation. *Obstet Gynecol* 1988;72(3 Pt 1):328-31.
 31. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007;88:795-803.
 32. Tarjanne S, Ng CHM, Manconi F, Arola J, Mentula M, Maneck B, et al. Use of hormonal therapy is associated with reduced nerve fiber density in deep infiltrating, rectovaginal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015;94:693-700.
 33. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Effect of progestogens and

- combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2009;92:1234-9.
34. Zevallos HBV, Mckinnon B, Tokushige N, Mueller MD, Fraser IS, Bersinger NA. Detection of the pan neuronal marker PGP9.5 by immunohistochemistry and quantitative PCR in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2015;291:85-91.
 35. Ellett L, Readman E, Newman M, McIlwaine K, Villegas R, Jagasia N, et al. Are endometrial nerve fibres unique to endometriosis? A prospective case-control study of endometrial biopsy as a diagnostic test for endometriosis in women with pelvic pain. *Hum Reprod* 2015;30:2808-15.
 36. Fraser IS. Added health benefits of the levonorgestrel contraceptive intrauterine system and other hormonal contraceptive delivery systems. *Contraception* 2013;87:273-9.
 37. Nisenblat V, Prentice L, Bossuyt PMM, Farquhar C, Hull ML, Johnson N. Combination of the non-invasive tests for the diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; CD012281.

Table 1. Selected baseline demographic and clinical characteristics of the participants.

	Treatment group				<i>P</i> -value
	ENG-implant (n=51)		LNG-IUS (n=52)		
Age (years; mean ± SD)	33.4	± 0.892	34.7	± 0.925	.286
Body mass index (kg/m ² ; mean ± SD)	27.1	± 0.752	27.8	± 0.710	.546
Ethnicity n (%)					.595
White	42 (80.8%)		39 (76.5%)		
Other	10 (19.2%)		12 (23.5)		
Years of schooling, n (%)					.602
0-8 years	5 (9.6)		3 (5.9)		
9-11 years	28 (53.8)		32 (62.7)		
≥12 years	19 (36.6)		16 (31.4)		
Parity, n (%)					.853
0	26 (50.0)		23 (45.1)		
1	13 (25.0)		13 (25.5)		
≥2	13 (25.0)		15 (29.4)		
ASRM Classification, n (%)					.654
Stage I + II	11 (21.2)		14 (27.4)		
Stages III + IV	18 (34.6)		14 (27.4)		
Deep endometriosis diagnosed at TVUS and MRI	23 (44.2)		23 (45.1)		

SD: standard deviation; ENG: etonogestrel; LNG-IUS: levonorgestrel-releasing intrauterine system; ASRM: American Society for Reproductive Medicine; TVUS: Transvaginal ultrasonography; MRI: Magnetic Resonance Imaging.

Table 2. Comparison of biomarkers, VAS non-cyclic pelvic pain, VAS dysmenorrhea scores before and up to 180 days according to treatment allocated

	Treatment allocated					
	ENG implant (n=52)			LNG –IUS (n=51)		
	Mean ±SD	95% CI	P- value ^d	Mean ±SD	95% CI	P- value ^d
CA 125 at baseline U/mL	45.4 ± 63.8	24.1;66.7	<.001	25.5 ± 31.1	15.0;36.0	.142
CA 125 180 days after U/mL	26.7 ± 41.6	12.9;40.6		22.7 ± 30.4	12.4;33.0	
CD23 at baseline U/mL	59.6 ±124.2	18.7;100.4	<.001	35.6 ± 75.7	9.0;61.9	<.001
CD23 180 days after U/mL	6.5 ± 13.2	2.1;10.8		6.2 ± 14.5	1.2;11.3	
Fiber nerve density at baseline	6.7 ± 8.4	3.5;9.9	<.001	7.4 ± 8.3	4.3;10.5	<.001
Fiber nerve density 180 days after	2.7 ± 4.1	1.2;4.3		2.1 ± 3.1	0.9;3.3	
VAS non-cyclic pain score at baseline	7.6 ± 1.6	7.1;8.0	<.001	7.4 ± 1.7	6.9;7.9	<.001
VAS non-cyclic pain score 180 days after	1.9 ± 2.3	1.2;2.6	<.001	1.9 ± 1.6	1.3;2.4	<.001
VAS dysmenorrhea score at baseline	7.5 ± 1.6	7.1;8.4	<.001	7.4 ± 1.75	6.9;7.9	<.001
VAS dysmenorrhea score 180 days after	2.1 ± 3.2	1.1;3.2	<.001	1.9 ± 2.2	1.1;2.6	<.001

ENG: Etonogestrel; LNG-IUS: levonorgestrel-releasing intrauterine system; SD: Standard deviation; CI: Confidence Interval; ^d P-value for the Wilcoxon test for related samples for comparison of variables between onset and after 180 days.

FIGURE CAPTION

Figure 1: Flowchart diagram

Figure 2. Comparison of ENG-implant and LNG-IUS users at baseline and 180 days after device placement. A) CA 125 levels; B) CD23 soluble levels; C) fiber nerve density; D) dysmenorrhea; E) VAS. ENG: etonogestrel; LNG-IUS: levonorgestrel-releasing intrauterine system; VAS: visual analog scale.

Figure 1: Flow Diagram

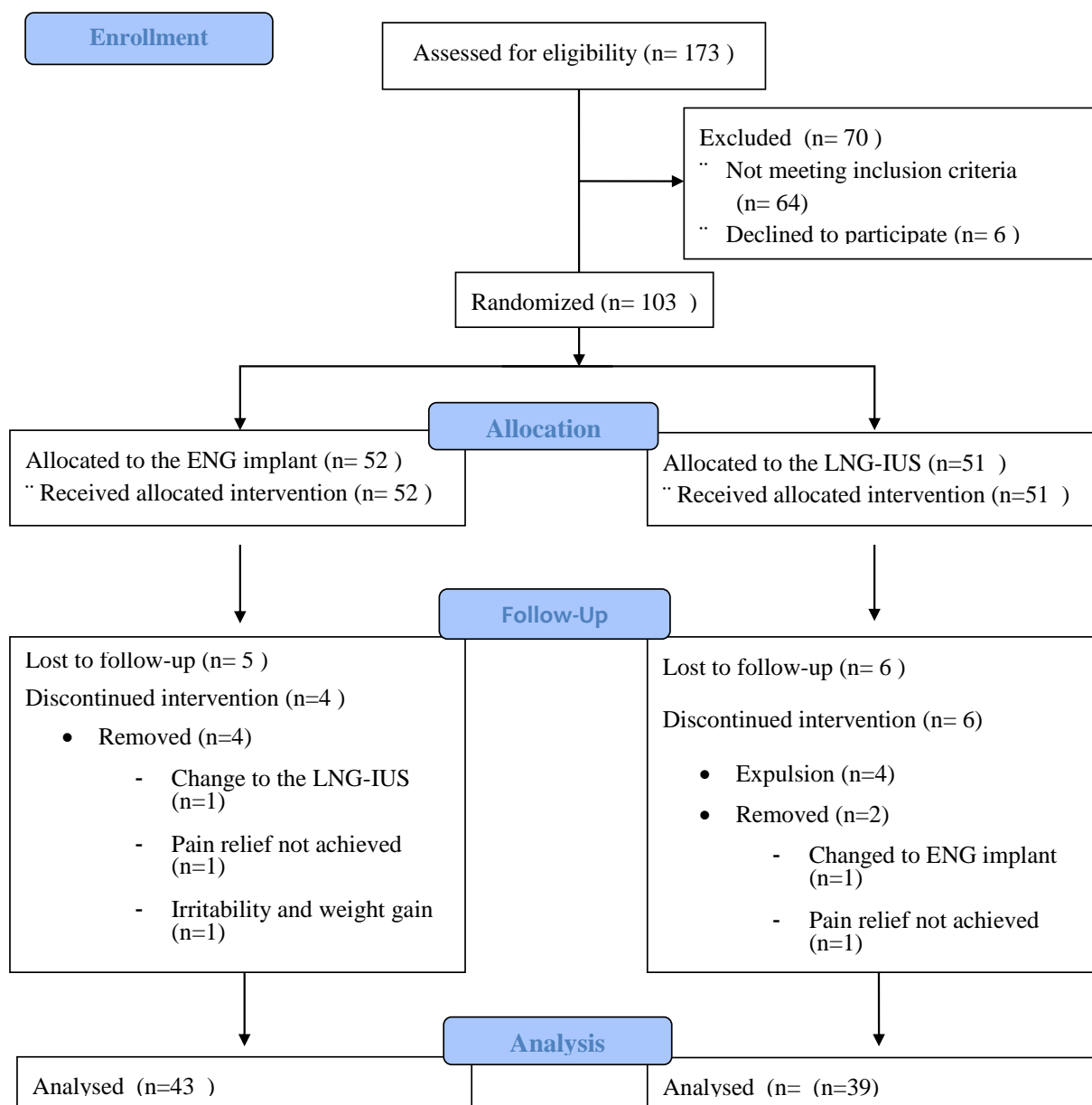
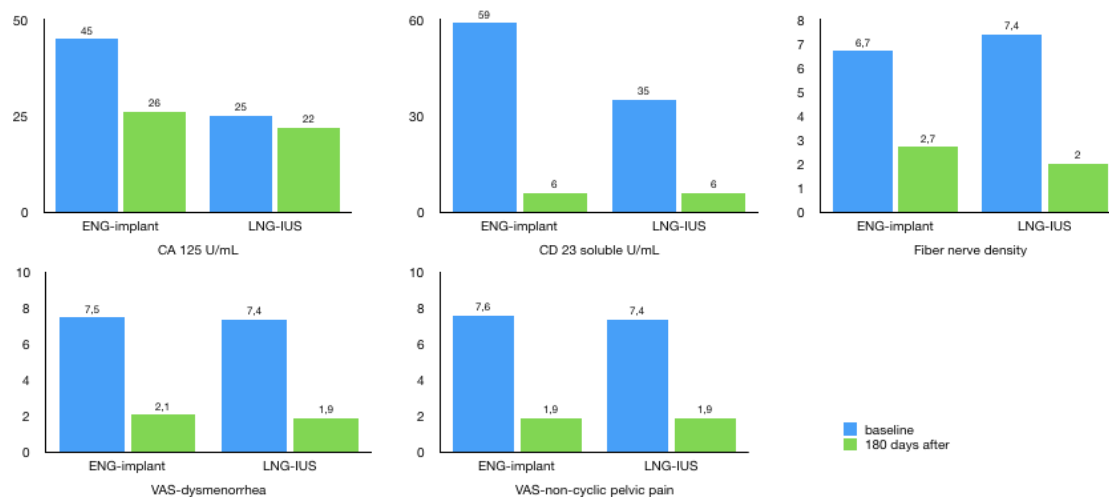


Figure 2



CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No
Title and abstract			
	1a	Identification as a randomised trial in the title	1
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	3-4
Introduction			
Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	5
	2b	Specific objectives or hypotheses	6
Methods			
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	6
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	N/A
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	7
	4b	Settings and locations where the data were collected	6
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	7-11
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	8-11
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	N/A
Sample size	7a	How sample size was determined	11
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	N/A
Randomisation:			
Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	8
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	8
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	8
Implementation	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	8
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and how	N/A

	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	N/A
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	11-12
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	N/A
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	26
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	26
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	6
	14b	Why the trial ended or was stopped	N/A
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	24
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	26
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	12-14, 25
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	13
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	N/A
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	N/A
Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	15,16
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	14-16
Other information			
Registration	23	Registration number and name of trial registry	16
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	At University of Campinas
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	17

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.

5. DISCUSSÃO

A endometriose é uma doença de difícil diagnóstico. Os sintomas de dismenorreia intensa, dor pélvica crônica e dispareunia geralmente estão associados à endometriose profunda, infiltrando mais de 5 mm o peritônio. A repetição da injúria tecidual provocada mensalmente pelo refluxo da menstruação para a pelve pode explicar o aumento da resposta inflamatória local, podendo também sugerir modificações epigenéticas, culminando no início da doença e sua progressão para invasão (11).

Ainda se desconhece o mecanismo exato de ação do LNG e da ENG na endometriose. Podemos especular que o efeito poderia ser local ou sistêmico ou poderia modular o sistema endócrino e imunológico endometrial local, reduzindo a atividade estrogênica e o estímulo de regulação de neurotrofinas e outras moléculas associadas ao incremento das fibras nervosas endometriais, justificando a melhora da dor pélvica através da redução das fibras nervosas endometriais.

Os resultados deste estudo mostraram que ambos os métodos contraceptivos com apenas progestogenio derivados da 19 nortestosterona de longa ação foram bem-sucedidos em uma redução significativa na dor pélvica crônica, dismenorréia, na redução dos níveis séricos dos biomarcadores CD-23, CA-125 e da densidade de fibras nervosas endometriais quando comparados os valores basais e aos 180 dias após a intervenção. Entretanto, não foi encontrada redução significativa dos níveis do CA 125 no grupo de SIU-LNG como mostrado em estudos anteriores(46, 47). Embora o CA 125 tenha baixa sensibilidade e especificidade, ele ainda é o marcador mais usado em endometriose (18,20,22,23). No grupo de implante de ENG, foi observada redução nos níveis séricos do CA 125 após 180 dias da intervenção. Neste grupo, nós notamos que o percentual de pacientes com menos de 2 episódios de sangramento nos últimos 90 dias avaliados (amenorréia e sangramento infrequente) foi de 53%. Isto pode estar associado com a redução do sangramento uterino assim como do refluxo uterino e provavelmente do sangramento no foco endometriótico. No entanto, no grupo de SIU-LNG, em que não foi evidenciado redução significativa dos níveis de CA-125, apenas 37,5% das participantes apresentaram amenorréia ou sangramento irregular nos últimos 90 dias observados.

Além disso, observamos que houve queda significativamente dos níveis de CD-23 solúvel na avaliação de 180 dias após a intervenção, em ambos os braços

do estudo, sugerindo que a função ovariana pode ter influência na resposta imune, na modulação da ativação de células B, como sugerido anteriormente (25, 26, 58).

Estudos prévios mostraram que mulheres com endometriose apresentam fatores neurotróficos que estimulam o aumento da atividade dos nervos e incrementam a percepção da dor (31). O endométrio eutópico de mulheres com endometriose pode mostrar diferentes estruturas, diferentes expressões moleculares, apoptose, componentes imunológicos, moléculas de adesão celular, proteases e fibras nervosas quando comparados a mulheres sem endometriose (19, 29, 31). Observamos que houve redução significativa da densidade de fibras nervosas no endométrio aos 180 dias após a inserção dos dispositivos com progestogênios, sugerindo, como estudos anteriores (32, 55, 57), uma ferramenta diagnóstica indireta ou um marcador substituto menos invasivo, porém não houve correlação direta, com significado estatístico, com a redução dos níveis de dor e dismenorreia pela EVA. Uma das limitações do nosso estudo foi que, além da endometriose, miomas e adenomiose poderiam aumentar a imuno-reatividade das fibras nervosas endometriais coradas pelo PGP9.5, não sendo específico, porém estariam associados à dor (61).

Embora ambos os contraceptivos testados em nosso estudo tenham melhorado os escores de dor pélvica crônica e dismenorreia, não houve correlação significativa em relação à redução de biomarcadores séricos e endometriais nos dois grupos. Estes achados sustentam as diretrizes mais recentes do ESHRE que sugerem não há biomarcador ideal para endometriose (1).

Embora pelas últimas diretrizes do ESHRE de 2015 (1) não seja recomendado para diagnóstico a solicitação de qualquer biomarcador, seja sérico ou urinário ou até mesmo histológico eles são muito estudados para sugerir métodos não invasivos para diagnóstico da doença, tendo em vista casos assintomáticos, suspeita de endometriose na adolescente, suspeita de endometriose em infertilidade sem a ocorrência de dor (19, 20, 33). Tendo em vista isto, há uma instituição global para pesquisa em endometriose, a World Endometriosis Research Foundation (WERF), que trabalha com 75 instituições em 30 países. Eles desenvolveram um biobanco (Endometriose Phenome and Biobanking Harmonisation Project-EPHect) com amostras séricas, teciduais, urinárias, com padronização e harmonização de dados fenotípicos cirúrgicos, clínicos além de padronizar métodos biológicos de coleta de amostras em pesquisas sobre endometriose (62).

Não podemos negar que o diagnóstico *gold standart* ainda é a cirurgia. Há uma revisão sistemática de 2004, que determina a acurácia do diagnóstico da endometriose por laparoscopia em que a sensibilidade foi 94% e a especificidade 79%(14). No entanto, há de se pontuar os riscos inerentes ao procedimento cirúrgico (20). Tais riscos incluem, dentre outros, lesão de órgãos, hemorragia, infecção e formação de aderência, além de complicações anestésicas gerais. Além disso, ponderar custos financeiros ao paciente e ao sistema de saúde, tempo necessário para ficar afastado das atividades laborais e familiares. O ideal seria um teste não invasivo com alta sensibilidade e especificidade, ou seja, um teste com probabilidade de ser positivo quando a mulher apresenta a endometriose e ser negativo quando a mulher não apresenta a doença. Mas este teste não existe até o momento, muito menos uma associação de testes.

Tentamos seguir ao máximo o protocolo proposto, as pacientes tiveram boa receptividade aos métodos propostos, das 51 pacientes do braço do SIU-LNG, 6 perderam seguimento e 6 descontinuaram, sendo 3 expulsos e 3 removidos. Já no braço do implante, das 52 mulheres, 5 perderam seguimento e 4 descontinuaram. Em nosso estudo, o seguimento se deu por 6 meses. Há necessidade de estudos, com seguimento por um tempo maior, pelo menos 24 a 36 meses, avaliando dor associado a concentração sérica de LNG e ENG.

6. CONCLUSÃO

Os valores dos níveis séricos de CA-125 basal foram semelhantes em ambos os grupos de tratamento e foram significativamente menores aos 180 dias entre as usuárias do implante liberador de ENG.

Os valores dos níveis séricos de CD 23 basal foram semelhantes em ambos os grupos de tratamento e foram significativamente menores aos 180 dias entre as usuárias do implante liberador de ENG e do SIU-LNG.

Os valores da densidade de fibras nervosas no endométrio basal foram semelhantes em ambos os grupos de tratamento e foram significativamente menores aos 180 dias entre as usuárias do implante liberador de ENG e do SIU-LNG.

Não houve correlação significativa, entre a redução dos escores de dor pélvica e dismenorreia com a redução dos biomarcadores em ambos os grupos ao longo do tempo observado.

7. REFERÊNCIAS

1. Dunselman GAJ, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction*. 2014; 29: 400-412.
2. Bedaiwy MA, Alfaraj S, Yong P, Casper R. New developments in the medical treatment of endometriosis. *Fertil Steril*. 2017;107:555-565.
3. Nap AW. Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *Endometr Sci Pract*. 2012;11:42–53.
4. Subramanian A, Agarwal N. Endometriosis - Morphology, clinical presentations and molecular pathology. *J Lab Physicians*. 2010;2:1-9.
5. Brown J, Farquhar C. An Overview of Treatments for Endometriosis. *JAMA*. 2015;303:296-297.
6. Vercellini, Paolo; Viganò, Paola; Somigliana, Edgardo; Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:261–75.
7. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.
8. Nezhat C, Nezhat F, Nezhat C. Endometriosis: Ancient disease, ancient treatments. *Fertil Steril* 2012;98(6):S1–62.
9. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98(3): 511–9.
10. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997;68(4):585-596.
11. Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertil Sterility*. 2017;108(6):872-885.
12. Johnson NP, Hummelshoj L, Adamson GD, Keckstein J, Taylor HS, Abrao MS, et al. World endometriosis society consensus on the classification of endometriosis. *Hum Reprod*. 2016;1-10.
13. Chamié, L P; Blasbalg, R; Gonçalves, M O C; Carvalho, F M; Abrão, M S; Oliveira IS. Accuracy of magnetic resonance imaging for diagnosis and preoperative assessment of deeply infiltrating endometriosis. *Int J Gynecol Obstet*. 2009;106(3):198–201.

14. Nisenblat V, Bossuyt PMM, Farquhar C, Johnson N, Hull ML. Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;CD009591.
15. Haas D, Shebl O, Shamiyeh A, Oppelt P. The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: Their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013;92:3-7.
16. Singh SS, Suen MWH. Surgery for endometriosis: beyond medical therapies. *Fertil Steril*. 2017;103(3):549-554.
17. Fassbender A, Burney RO, O DF, D'Hooghe T, Giudice L. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *BioMed Research International*. 2015;1-14.
18. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: A systematic review. *Hum Reprod Update*. 2010;16(6):651-674.
19. Ahn SH, Singh V, Tayade C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertil Steril*. 2017;107:523–32.
20. Nisenblat V, Prentice L, Bossuyt PMM, Farquhar C, Hull ML, Johnson N. Combination of the non-invasive tests for the diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;CD012281.
21. Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Ferriani RA. Serum CA-125 in the diagnosis of endometriosis. *Int J Gynecol Obstet*. 2007;96(3):206-207.
22. Mol BWJ, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MAHM, Bongers MY, Van Der Veen F, et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: A meta-analysis. *Fertil Steril*. 1998;70(6):1101-1108.
23. Hirsch M, Duffy J, Davis C, Plana MN, Khan K. Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 for endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2016;123:1761-1768.
24. Yucel N, Baskent E, Karamustafaoglu Balci B, Goynumur G. The levonorgestrel-releasing intrauterine system is associated with a reduction in dysmenorrhoea and dyspareunia, a decrease in CA 125 levels, and an increase in quality of life in women with suspected endometriosis. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol*. 2018;1-4.

25. Odukoya O, Bansal A, Cooke I. Serum endometrial IgG antibodies and soluble CD23 concentrations in patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1996; 75: 927-931.
26. Odukoya O-A, Bansal A, Wilson P, Kxim, Weetman AP, Cooke ID. Soluble CD23 protein in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod.* 1996;11(9):2018–21.
27. Luna Ramos IM de, Podgaec S, Abrão MS, Oliveira R de, Baracat EC. Evaluation of CA-125 and soluble CD-23 in patients with pelvic endometriosis: a case-control study. *Rev Assoc Med Bras* 2012;58(1):26–32.
28. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2007; 88(4):795-803.
29. Zevallos HBV, Mckinnon B, Tokushige N, Mueller MD, Fraser IS, Bersinger NA. Detection of the pan neuronal marker PGP9.5 by immunohistochemistry and quantitative PCR in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;291:85-91.
30. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2006;21(3):782-787.
31. Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, Tokushige N, Luscombe GM, Markham R, et al. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: A double blind study. *Hum Reprod.* 2009;24(12):3019-3024.
32. Newman TA, Bailey JL, Stocker LJ, Woo YL, MacKlon NS, Cheong YC. Expression of neuronal markers in the endometrium of women with and those without endometriosis. *Human Reproduction.* 2013; 28(9): 2502-2510.
33. Gupta D, Hull ML, Fraser I, Miller L, Bossuyt PMM, Johnson N, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2016;CD012165.
34. Practice T, Medicine R. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: A committee opinion ASRM. *Fertil Steril.* 2014;101(4):927–35.
35. Vercellini P, Buggio L, Somigliana E. Role of medical therapy in the management of deep rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 2017;108(6):913–30.

36. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, et al. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*. 2003; 46(S1):S7-S16.
37. Fraser IS. Added health benefits of the levonorgestrel contraceptive intrauterine system and other hormonal contraceptive delivery systems. In: *Contraception*. 2013;87:273-279.
38. Casper RF. Progestin-only pills may be a better first-line treatment for endometriosis than combined estrogen-progestin contraceptive pills. *Fertil Steril*. 2017;107(3):533-536.
39. Fillingim RB, Ness TJ. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2000; 24:485-501.
40. Máximo MM, Silva PS, Vieira CS, Gonçalves TM, Rosa-E-Silva JC, Candido-Dos-Reis FJ, et al. Low-dose progestin-releasing contraceptives are associated with a higher pain threshold in healthy women. *Fertil Steril*. 2015; 104(5):1182-1189.
41. Lockhat FB, Emembolu JO, Konje JC. The evaluation of the effectiveness of an intrauterine-administered progestogen (levonogestrel) in the symptomatic treatment of endometriosis and in the staging of the disease. *Hum Reprod*. 2004;19(1):179-184.
42. Bahamondes L, Bahamondes MV, Shulman LP. Non-contraceptive benefits of hormonal and intrauterine reversible contraceptive methods. *Hum Reprod Update*. 2015;21(5):640–51.
43. <https://pharma.bayer.com.br/pt/produtos/produtos-bulas/visualiza-produto.php?codigo=mirena>. Acesso em 18 de junho de 2018.
44. Curtis, K M; Peipert JF. Long-Acting Reversible Contraception. *New Engl Journal Med*. 2017;376:461–8.
45. <https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodDetail&anvisaId=1017100880029>. Acesso em 18 de junho de 2018.
46. de Sá Rosa e Silva ACJ, Rosa e Silva JC, Nogueira AA, Petta CA, Abrão MS, Ferriani RA. The levonorgestrel-releasing intrauterine device reduces CA-125 serum levels in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 2006; 86(3):742-744.
47. Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa e Silva JC, Podgaec S, et al. Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system

- and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20(7):1993-1998.
48. Vercellini P, Aimi G, Panazza S, De Giorgi O, Pesole A, Crosignani PG. A levonorgestrel-releasing intrauterine system for the treatment of dysmenorrhea associated with endometriosis: A pilot study. *Fertil Steril.* 1999; 72(3):505-508.
 49. Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Portuese A, Raffaelli R. Use of a levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;75(3):485-488.
 50. Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Aimi G, Zaina B, Crosignani PG. Comparison of a levonorgestrel-releasing intrauterine device versus expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril.* 2003;80(2):305-309.
 51. Walch K, Unfried G, Huber J, Kurz C, van Trotsenburg M, Pernicka E, et al. Implanon® versus medroxyprogesterone acetate: effects on pain scores in patients with symptomatic endometriosis - a pilot study. *Contraception.* 2009; 79:29-34.
 52. Ponpuckdee, J; Taneepanichskul S. No Title. *J Med Assoc Thai* 2005;88(Suppl 2):S7-10.
 53. Yisa SB, Okenwa AA, Husemeyer RP. Treatment of pelvic endometriosis with etonogestrel subdermal implant (Implanon®). *J Fam Plan Reprod Heal Care.* 2005;31(1):67–70.
 54. Gerlinger C, Schumacher U, Faustmann T, Colligs A, Schmitz H, Seitz C. Defining a minimal clinically important difference for endometriosis-associated pelvic pain measured on a visual analog scale: Analyses of two placebo-controlled, randomized trials. *Health Qual Life Outcomes.* 2010;8(138):1-7.
 55. Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 2009;92(4):1234-1239.
 56. Belsey EM, Macchin D, d'Arcangues C. The analysis of vaginal bleeding patterns induced by fertility regulating methods. World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. *Contraception.* 1986;34(3):253-60.

57. Tarjanne S, Ng CHM, Manconi F, Arola J, Mentula M, Maneck B, et al. Use of hormonal therapy is associated with reduced nerve fiber density in deep infiltrating, rectovaginal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015;94: 693-700.
58. WHO. Medical Eligibility criteria for Contraceptive Use. 2015;1–276. Available from: [www.who.int/reproductive health](http://www.who.int/reproductive-health)
59. Matalliotakis IM, Neonaki MA, Koumantaki YG, Goumenou AG, Kyriakou DS, Koumantakis EE. A randomized comparison of danazol and leuprolide acetate suppression of serum-soluble CD23 levels in endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2000; 95(6):810-813.
60. Beasley A. C o n t r a c e p t i v e P r o c e d u r e s Intrauterine device Contraceptive implant Levonorgestrel Etonogestrel. 2013;40: 697-729.
61. Ellett L, Readman E, Newman M, McIlwaine K, Villegas R, Jagasia N, et al. Are endometrial nerve fibres unique to endometriosis? A prospective case-control study of endometrial biopsy as a diagnostic test for endometriosis in women with pelvic pain. *Human Reproduction*. 2015; 30(12): 2808-2815.
62. <https://endometriosisfoundation.org/>.

8. ANEXOS

Anexo 1. Estadiamento da endometriose pela ASRM(12)

ENDOMETRIOSE		TAMANHO DA LESÃO		
		1 cm	1-3 cm	>3cm
PERITÔNIO	SUPERFICIAL	1	2	4
	PROFUNDA	2	4	6
OVÁRIO	SUPERFICIAL	1	2	4
DIREITO	PROFUNDA	4	16	20
OVÁRIO	SUPERFICIAL	1	2	4
ESQUERDO	PROFUNDA	4	16	20
OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE		PARCIAL	4	
SACO POSTERIOR		COMPLETA	40	
SUPERFÍCIE BLOQUEADA		<1/3	1/3 a 2/3	>2/3
OVÁRIO	VELAMENTOSAS	1	2	4
DIREITO	DENSAS	4	8	16
OVÁRIO	VELAMENTOSAS	1	2	4
ESQUERDO	DENSAS	4	8	16
TUBA	VELAMENTOSAS	1	2	4
DIREITA	DENSAS	4*	8*	16
TUBA	VELAMENTOSAS	1	2	4
ESQUERDA	DENSAS	4*	8*	16

*Se fímbria completamente bloqueada, a pontuação será 16.

Estádio I: Endometriose mínima, mulheres com escore total de 1-5 pontos.

Estádio II: Endometriose leve, mulheres com escore total de 6-15 pontos.

Estádio III: Endometriose moderada, mulheres com escore total de 16-40 pontos.

Estádio IV: Endometriose severa, mulheres com escore total acima de 40 pontos.

Exemplos de estadiamento pela ASRM:

Normal



Estadio I - Mínima

ESTADIO I (MÍNIMA)



Estadio II - Leve

ESTADIO II (LEVE)



Estadio III - Moderada

ESTADIO III (MODERADA)



ESTADIO III (MODERADA)



Estadio IV - Severa

ESTADIO IV (SEVERA)



ESTADIO IV (SEVERA)



Anexo 2: Classificação de Enzian 2012 para endometriose profunda (16).

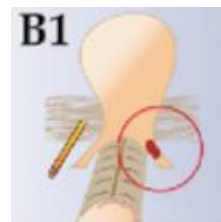
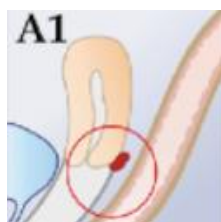
Compartimentos

A, B OU C



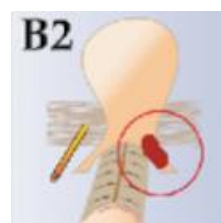
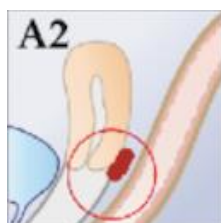
GRAU 1

<1 CM



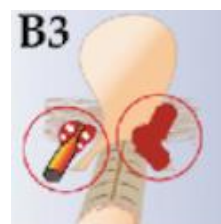
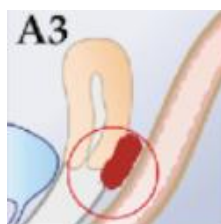
GRAU 2

1-3 CM



GRAU 3

>3 CM



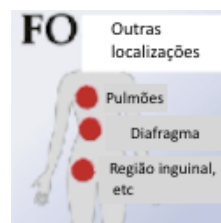
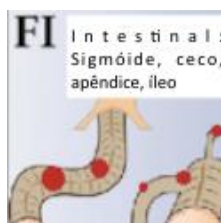
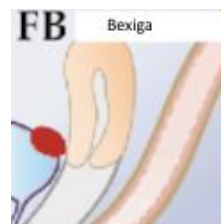
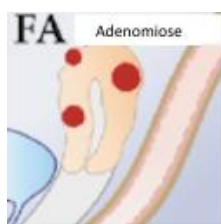
Outros tipos de

infiltração

profunda

extragenital e

uterina



Anexo 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Ensaio clínico randomizado da avaliação dos níveis séricos dos marcadores CA-125 e CD-23 e da densidade das fibras nervosas no endométrio de pacientes com dor associada à endometriose antes e aos 6 meses de uso do sistema intrauterino liberador de levonorgestrel ou do implante subdérmico de etonogestrel

Pesquisador responsável pelo projeto: Dra Deborah Margatho Ramos Gonçalves Orientador: Prof. Dr. Luis Bahamondes
Número do CAAE: 57797616.8.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

A endometriose é uma doença na qual há desenvolvimento de células endometriais fora do útero. Este estudo é complementar a outro estudo sobre dor e endometriose, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e visa avaliar dois tratamentos hormonais (DIU hormonal e implante hormonal) para a melhora da dor em mulheres com esta doença, as amostras para a análise de sangue já foram coletadas anteriormente para este estudo. Ambos os produtos estão aprovados para uso no Brasil como métodos contraceptivos, o DIU com nome de Mirena® e o implante com nome de Implanon®.

Este estudo avaliará níveis de duas substâncias no sangue a quantidade de fibras nervosas do útero antes e seis meses depois da entrada no estudo.

Procedimentos:

Você será convidada no dia da consulta no ambulatório de Planejamento Familiar da Unicamp para ingressar no estudo. Na primeira consulta, se você estiver usando algum método contraceptivo hormonal, será colocado ou o DIU hormonal ou o implante (após sorteio), e esse outro método será suspenso imediatamente. Porém, se não estiver usando métodos contraceptivos hormonais, aguardaremos a próxima menstruação para a inserção do DIU ou do implante. O tratamento oferecido se dará por meio de sorteio, DIU hormonal ou implante. Durante o acompanhamento do estudo, serão necessárias duas consultas em nosso serviço, sendo a primeira no dia em que aceitar participar e a outra com mais ou menos seis meses após. Nesses dois momentos, você deverá: responder o grau de sua dor e dor na relação sexual através da visualização de uma escala da dor; ser submetida a biópsia de endométrio (revestimento interno do útero). Apenas na primeira consulta você será submetida a um exame de ultrassonografia pélvica por via endovaginal (pela vagina) ou por via transabdominal (pela barriga).

Desconfortos e riscos:

Quanto ao exame de ultrassonografia, o desconforto é mínimo. Será usado preservativo estéril para o exame via endovaginal. Quanto à biópsia endometrial, geralmente é um procedimento indolor e consiste em colocar um canudinho, através do colo do útero para realizar coleta de amostras (biópsias) do seu endométrio, pode haver cólica e pouco sangramento após a sua realização. Para a colocação do DIU é necessário colocação dentro da vagina do aparelho que chamamos de espécule ("bico de pato") para posterior introdução do DIU. Geralmente pode haver leve sangramento e dor tipo cólica menstrual e que melhoram momentos após. Pode ocorrer expulsão do DIU, e com isto, você sairá do estudo, mas será acompanhada no ambulatório e poderá colocar novamente outro DIU. Pode ocorrer perfuração do útero no momento da sua inserção (ocorrência de 1 caso em 1000), necessitando de cirurgia (laparoscopia) para removê-lo caso ocorra esta intercorrência. Neste caso você não poderá participar do estudo, mas será acompanhada e tratada desta complicação em nosso serviço, podendo ser necessário nesse caso, realizar uma cirurgia como mencionado anteriormente. Em relação ao implante, sua colocação é feita embaixo da pele do braço a 8 cm do cotovelo, com anestesia local. Geralmente a dor da colocação é leve. Pode ficar um

pequeno acúmulo de sangue no local (hematoma) e pouca dor, que melhoram após alguns dias. Poderá ocorrer expulsão do implante e neste caso você não poderá participar do estudo, no entanto podemos oferecer outro tratamento para controle da dor.

Você não deve participar deste estudo se: não estiver entre 18 e 45 anos; possuir desejo atual de engravidar ou estiver grávida; tiver história de parto com infecção ou aborto infectado nos últimos 3 meses; estiver com infecção aguda no colo do útero caracterizada por presença de secreção com pus (chamada de cervicite purulenta); apresentar doenças malignas (câncer) no colo do útero ou na mama; apresentar doenças malignas (câncer) que sejam dependentes de hormônios; apresentar sangramento uterino sem causa definida; tiver história de anormalidades uterinas, de nascimento ou adquiridas no decorrer da vida; você não possuir útero (removido por meio de cirurgia ou anormalidade de nascimento); você possuir condições associadas com aumento do risco de infecções pélvicas,

como possuir múltiplos parceiros sexuais e não possuir hábito de usar preservativos; você possuir doenças ativas do fígado; você possuir tumor maligno no fígado; você tiver história de entupimento nas veias (chamado de trombose); você apresentar ou tiver história de alergia de qualquer componente do DIU de hormônio ou do implante; fizer uso abusivo de álcool ou drogas ilícitas.

Benefícios:

O principal benefício a você na participação deste estudo é controlar e minimizar a dor causada pela endometriose. Além disto, através de sua participação, este estudo estará contribuindo para o avanço do conhecimento sobre o tratamento da dor pélvica nas mulheres que têm endometriose.

Acompanhamento e assistência:

As participantes da pesquisa serão acompanhadas no ambulatório de Planejamento Familiar pela própria pesquisadora e por uma equipe de pesquisa. Havendo melhora significativa dos sintomas de dor, lhe será garantido o uso posteriormente do método (implante ou DIU medicado) após término do estudo. Caso apresente qualquer efeito adverso decorrente da medicação, você poderá ter atendimento no próprio ambulatório onde é realizada a pesquisa. É também garantido seu tratamento após o término do estudo assim como no caso de você

desistir do estudo. Você será informada de qualquer alteração no estudo ou qualquer nova informação pertencente ao mesmo.

Fica também assegurada a todas as participantes que ao final do estudo, possuam acesso gratuito e por tempo indeterminado, ao melhor método terapêutico (caso comprovado benefício) tão logo a sua participação individual no estudo tenha terminado e pelo tempo que lhe for benéfico.

Sigilo e privacidade:

As informações sobre seus dados gerados na participação deste estudo serão registrados em seu prontuário. Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores; os resultados de seus exames poderão ser utilizados em trabalhos científicos. Solicitamos também a sua autorização para que possamos publicar os resultados do estudo em congressos e revistas científicas sem que seu nome seja citado ou que apareça.

Ressarcimento e Indenização:

Será fornecido ressarcimento em casos de gastos relativos à transporte e alimentação, e também dos acompanhantes, quando necessário, em cada uma das consultas agendadas da pesquisa. Você deverá estar ciente de que não receberá compensação financeira por participação neste estudo.

A Sra. terá a garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Armazenamento de material biológico:

As biópsias endometriais serão armazenadas em local adequado da UNICAMP (no acervo do laboratório de patologia do HC da UNICAMP). Serão usadas todas as amostras para a finalidade deste projeto específico e caso haja excedentes os mesmos serão descartados ao final da pesquisa.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo ou no caso de qualquer efeito adverso que venha a ter com a medicação, você poderá entrar em contato via telefone ou mesmo procurar atendimento, nos telefones (19) 3289-2856, (19) 35217087, (19) 35217176 ou (19) 35217642 e falar com a pesquisadora, ou com membros da equipe do projeto, das 07:00 às 11:00 horas, às segundas, terças,

quartas e sextas-feiras no ambulatório de Planejamento Familiar. Situado na Rua Vital Brasil, 200, Cidade Universitária, Departamento de Tocoginocologia, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Prédio em frente a porta do HC da UNICAMP). Também pode enviar e-mails para: debmargatho@gmail.com, bahamond@caism.unicamp.br. Em caso de necessidade de atendimento de urgência fora do horário do ambulatório, você poderá procurar o Pronto Socorro do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), localizado na UNICAMP, Rua Alexander Fleming, 101, Cidade Universitária, Campinas, estado de São Paulo.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito

participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____

e-mail (opcional): _____

(Assinatura da participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Data: ____/____/____

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de




Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante.

Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____

(Assinatura do pesquisador)

Anexo 4. Escala visual analógica de dor (EVA) (55)

			
AVALIAÇÃO DA DOR AO INICIAR O ESTUDO			
Número do estudo:		Número de alocação:	
Por favor marque o número que você acredita corresponder à intensidade da dor que você vem sentindo conforme escala (régua) lhe fornecida. Sendo 0: sem dor; 1 a 4: dor leve; 5 a 7: dor moderada; 8 a 10: a pior dor existente			
Primeira visita		Data:	
Sem dor	Dor leve	Dor moderada	A pior dor existente
			
Assinatura do pesquisador:			
AVALIAÇÃO DA DOR APÓS 6 MESES DA ENTRADA NO ESTUDO			
Número de alocação:			
Por favor marque o número que você acredita corresponder à intensidade da dor que você vem sentindo conforme escala (régua) lhe fornecida. Sendo 0: sem dor; 1 a 4: dor leve; 5 a 7: dor moderada; 8 a 10: a pior dor existente			
Segunda visita		Data:	
Sem dor	Dor leve	Dor moderada	A pior dor existente
			
Assinatura do pesquisador			

Anexo 5. FICHA DE COLETA DE DADOS

Título do Estudo: Ensaio clínico randomizado da avaliação dos níveis séricos dos marcadores CA-125 e CD-23 e da densidade das fibras nervosas no endométrio de pacientes com dor associada à endometriose antes e aos 6 meses de uso do sistema intrauterino liberador de levonorgestrel ou do implante subdérmico de etonogestrel.

NÚMERO DE ALOCAÇÃO: _____

Data da primeira visita (inserção do tratamento alocado): _____

☐ SIU-LNG ☐ implante ENG

Idade (em anos completos): _____

Cor a pele: ☐ branca ☐ preta ☐ parda ☐ indígena

Idade da menarca (em anos completos): _____

Número de partos:

☐ Nulípara ☐ Primípara ☐ Secundípara ☐ Tercípara ☐ Multípara

Número de gestações:

☐ Nuligesta ☐ Primigesta ☐ Secundigesta ☐ Tercigesta ☐ Multigesta

Número de abortos:

☐ Nenhum ☐ Um ☐ Dois ☐ Três ou mais

Índice de massa corpórea (IMC):

Peso: _____ kg Estatura: _____ m IMC: _____ kg/m²

☐ Baixo peso <18,5 kg/m²

☐ Adequado entre 18,5-24,9 kg/m²

☐ Sobrepeso entre 25-29,9 kg/m²

☐ Obesidade entre 30-39,9 kg/m²

☐ Obesidade mórbida acima de 40 kg/m².

Uso de medicações para dor no início do estudo: ☐ Sim ☐ Não

Grau da endometriose: Cirúrgico: ☐ Sim ☐ Não

☐ grau I, mínima ☐ grau II, leve

☐ grau III, moderada ☐ grau IV, grave

Imagem: ☐ Sim ☐ Não

Órgão/compartimento acometido:

PRIMEIRA VISITA – inserção do tratamento alocado DATA: _____

④ SIU-LNG ④ Implante ENG

Escore de dor pela EVA:

④ 0: sem dor

④ 1 a 4: dor leve

④ 5 a 7: dor moderada

④ 8 a 10: dor severa

CA-125 _____ CD-23 _____

Densidade de Fibras Nervosas _____

SEGUNDA VISITA – 180 dias após inserção do tratamento alocado

DATA: _____

Escore de dor pela EVA:

④ 0: sem dor

④ 1 a 4: dor leve

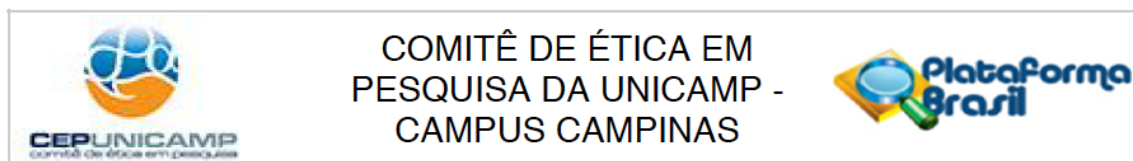
④ 5 a 7: dor moderada

④ 8 a 10: dor severa

CA-125 _____ CD-23 _____

Densidade de Fibras Nervosas _____

Anexo 6. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS MARCADORES CA-125 E CD-23 E DA DENSIDADE DAS FIBRAS NERVOSAS NO ENDOMÉTRIO DE PACIENTES COM DOR ASSOCIADA À ENDOMETRIOSE ANTES E AOS 6 MESES DE USO DO SISTEMA INTRAUTERINO LIBERADOR DE LEVONORGESTREL OU DO IMPLANTE SUBDÉRMICO DE ETONOGESTREL

Pesquisador: DEBORAH MARGATHO RAMOS GONÇALVES

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 57797616.8.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.764.572

Apresentação do Projeto:

Ensaio clínico, randomizado, aberto, comparativo, no qual serão avaliados níveis séricos dos marcadores CA-125 e CD-23 e a densidade de fibras nervosas no endométrio de pacientes com dor associada à endometriose antes e aos 6 meses de uso do SIU-LNG ou do implante subdérmico de ENG. Este é um estudo piloto onde viremos a avaliar ambas opções terapêuticas propostas, o SIU-LNG e o implante subdérmico de ENG. Está previsto incorporar 50 mulheres em cada braço do estudo para com isto, calcular o poder da amostra no final do estudo. Em revisão de literatura, dois ensaios clínicos randomizados evidenciaram significativa melhora da dor pélvica em mulheres com endometriose e uso de SIU-LNG, o número de sujeitos ficou entre 20 e 82 (Vercellini et al., 2003; Petta et al., 2005). E em outro estudo clínico prospectivo também evidenciado melhora da dor e redução de lesão endometriótica em 11 mulheres avaliadas (Fedele et al., 2001). O cálculo do tamanho da amostra mínimo foi estimado em 42 mulheres por grupo estudado. Baseado na

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

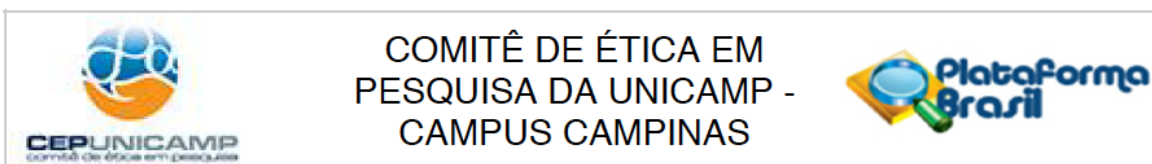
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

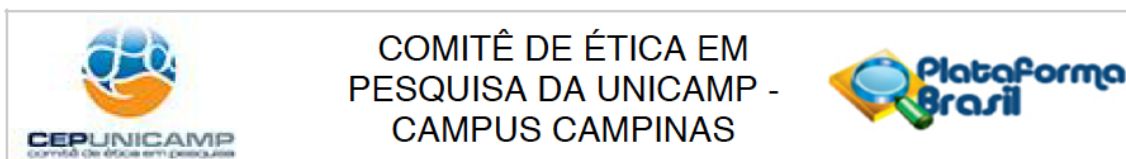
E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.764.572

melhora clínica de 100% da dor pélvica em mulheres após a inserção do SIU-LNG, previamente observados nos estudos acima descritos e estabelecendo uma diferença máxima de 20% de melhora entre os grupos de tratamento. Esse valor foi calculado considerando $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,20$, com $p < 0,05$ como significativo, tendo em conta uma taxa de perda de seguimento em torno de 20%. Critério de Inclusão: Mulheres com idade entre 18 e 45 anos; mulheres com diagnóstico e estadiamento cirúrgico de endometriose (segundo a ASRM, 1997); mulheres com dor pélvica crônica e/ou dismenorréia com escores de dor maior ou igual a 4 na escala visual analógica de dor; aceitar participar do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Critério de Exclusão: - Gravidez - Desejo atual de engravidar - Desejo de apenas usar o SIU-LNG como tratamento e controle da dor devido à endometriose - Antecedente pessoal de má formação mulleriana uterina ou anormalidades uterinas adquiridas, como sinéquias, ou ausência cirúrgica de útero - Contra-indicações ao uso do SIU-LNG: doença inflamatória pélvica atual ou recorrente; infecção aguda do trato genital inferior; apresentar ao exame clínico cervicite purulenta; história de aborto infectado nos últimos três meses; história de infecção puerperal nos últimos três meses; tumores malignos uterinos, cervicais, hormônios-dependentes; sangramento uterino genital de etiologia incerta ou sem diagnóstico; condições associadas ao aumento de susceptibilidade a infecções; doenças hepáticas agudas ou tumores malignos hepáticos; tromboembolismo agudo; hipersensibilidade ao levonorgestrel. - Contra-indicações ao uso do implante de ENG: tromboembolismo agudo; tumores malignos uterinos, hormônios-dependentes; sangramento uterino genital de etiologia incerta ou sem diagnóstico; doenças hepáticas agudas ou tumores malignos hepáticos; hipersensibilidade ao etonorgestrel ou a qualquer componente do implante. - Uso abusivo de drogas ilícitas ou álcool. - Obesidade mórbida. Desfecho Primário: Após seis meses de observação, os níveis de CA-125, CD-23 e densidades de fibras nervosas endometriais se verão reduzidos tanto com o uso do SIU-LNG como do implante subdérmico de ENG, assim como o escore de dor e dispareunia de profundidade em níveis semelhantes. Desfecho Secundário: Haverá diferenças significativas nos níveis séricos dos marcadores CA-125 e CD-23 entre as usuárias do implante de ENG e do SIU-LNG. Haverá maior redução nas concentrações séricas destes biomarcadores nas usuárias do implante de ENG, devido ao fato deste bloquear a ovulação em mais de 95% das usuárias. No entanto, nas usuárias do SIU-LNG ocorrerá uma maior redução na densidade das fibras nervosas no endométrio devido à maior concentração local deste progestogenio quando comparada a sua concentração sérica. As amostras (séricas e endometriais) serão armazenadas no BIOBANCO do CAISM/UNICAMP. As amostras serão avaliadas inicialmente e após 180 dias da intervenção. Posteriormente, se houver permissão da participante (pelo TCLE),

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.764.572

armazenaremos para possibilidades de estudos futuros.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Comparar níveis séricos dos marcadores CA-125 e CD-23 e da densidade das fibras nervosas no endométrio de pacientes com dor associada à endometriose com escore de dor e dispareunia de profundidade antes e aos 6 meses de uso do SIU-LNG ou do implante subdérmico liberador de ENG.

Objetivo Secundário: Comparar antes e aos 6 meses do uso do SIU-LNG e do implante de ENG, o escore de dor e dispareunia de profundidade com os níveis séricos do marcador CA-125. Comparar antes e aos 6 meses do uso do SIU-LNG e do implante de ENG, o escore de dor e dispareunia de profundidade com os níveis séricos do marcador CD-23. Comparar antes e aos 6 meses do uso do SIU-LNG e do implante de ENG, o escore de dor e dispareunia de profundidade com a densidade de fibras nervosas no endométrio. Comparar os níveis de CA-125, de CD-23 e a densidade de fibras nervosas no endométrio entre as usuárias do SIU-LNG e as do implante liberador de ENG.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações do pesquisador:

Riscos: Desconforto e hematoma na punção venosa para coleta de sangue, desconforto tipo cólica na coleta de amostra endometrial. Desconforto e cólica na inserção do DIU de levonorgestrel; possibilidades de perfuração uterina, necessitando cirurgia para removê-lo caso ocorra esta intercorrência. Desconforto, dor local e hematoma no local de inserção do implante subdérmico de etonogestrel.

Benefícios: Controle da dor pélvica, dismenorréia, metrorragia, dispareunia e contracepção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora esclarece em carta resposta anexada a plataforma Brasil que: "As biópsias endometriais serão armazenadas em local adequado da UNICAMP (no acervo do laboratório de patologia do HC da UNICAMP). Serão usadas todas as amostras para a finalidade deste projeto específico e caso haja excedentes os mesmos serão descartados ao final da pesquisa." O projeto de pesquisa contempla amostras teciduais (biópsias de endométrio) e sanguíneas. As amostras de sangue serão cedidas do biorrepositório da Dra Nelsilene Mota de Carvalho Tavares, pesquisadora principal da pesquisa: "Estudo experimental randomizado do uso do sistema liberador de levonorgestrel versus implante subdérmico liberador de etonogestrel no controle da dor em mulheres com endometriose" projeto já aprovado anteriormente pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

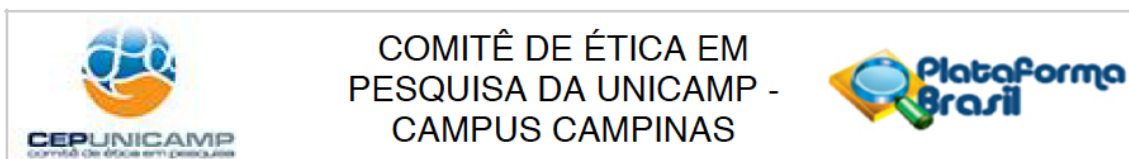
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.764.572

da UNICAMP com número do CAAE: 44827415.2.0000.5404. As amostras serão colhidas na admissão do estudo e 180 dias após intervenção, os ensaios laboratoriais serão analisados num mesmo momento. Anexado carta da Dra Nelsilene Mota de Carvalho Tavares transferindo amostras do seu biorrepositório ao meu. Em relação as amostras teciduais (biópsias de endométrio), serão armazenadas em formol tamponado a 10% e acondicionadas no acervo do laboratório de pós graduação da Patologia da UNICAMP. Anexada declaração de biorrepositório. Todas as amostras serão usadas e caso haja "sobras" ao final da pesquisa, estas serão descartadas".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto plataforma e Projeto completo- Adequada

TCLE: Adequada

Autorização do CAISM: Adequada

Comprovação de vínculo: Adequado

Folha de rosto: Adequada

Regulamento do biorrepositório: Adequado.

Declaração de transferência de amostras: Adequado

Cronograma e orçamento: Adequado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

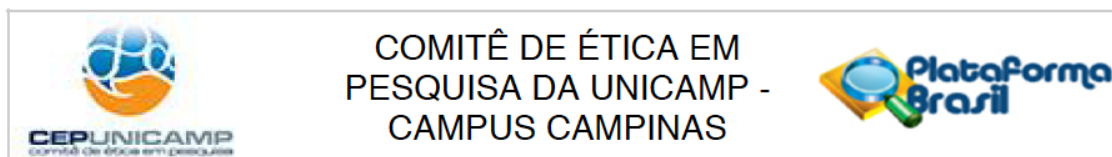
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.764.572

ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_747431.pdf	30/09/2016 10:41:31		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_CEP_2016.pdf	30/09/2016 10:41:08	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_transferencia_amstras_biorepositorio_SETEMBRO_2016.pdf	30/09/2016 08:32:03	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	Declaracao_biorrepositorio_SETEMBRO_2016.pdf	30/09/2016 08:31:45	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

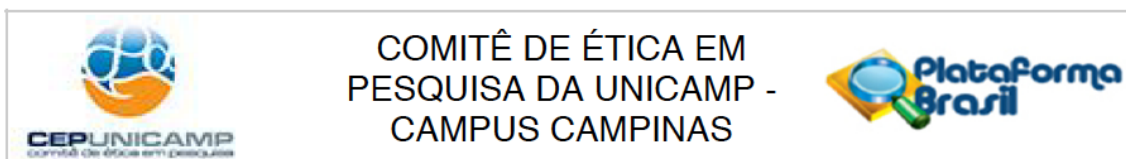
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.764.572

Biobanco	Declaracao_biorrepositorio_SETEMBRO_2016.pdf	30/09/2016 08:31:45	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SETEMBRO_2016.pdf	30/09/2016 08:31:28	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_SETEMBRO_2016.pdf	30/09/2016 08:31:11	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CORRIGIDO_AGOSTO_2016.pdf	26/08/2016 08:40:01	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_AGOSTO_2016.pdf	26/08/2016 08:38:13	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Outros	RESPOSTA_PARECER_CEP_AGOSTO_2016.pdf	26/08/2016 08:37:49	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_AGOSTO_2016.pdf	26/08/2016 08:37:21	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	26/08/2016 08:37:02	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Outros	Parecer_Circunstanciado.pdf	07/07/2016 09:24:38	Adriana Barros de Pedro Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_biorrepositorio_PDF.pdf	28/06/2016 12:04:26	DEBORAH MARGATHO RAMOS GONÇALVES	Aceito
Orçamento	Orcamento_Financeiro.pdf	28/06/2016 12:04:14	DEBORAH MARGATHO RAMOS	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_execucao.pdf	28/06/2016 12:04:03	DEBORAH MARGATHO RAMOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	27/06/2016 23:34:25	DEBORAH MARGATHO RAMOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/06/2016 23:33:43	DEBORAH MARGATHO RAMOS GONÇALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

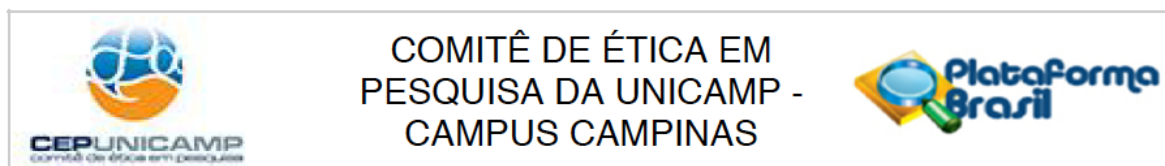
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

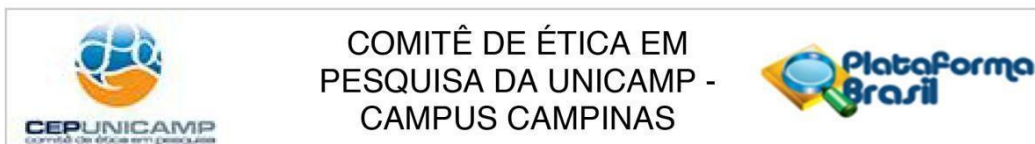


Continuação do Parecer: 1.764.572

CAMPINAS, 06 de Outubro de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo experimental randomizado do uso do sistema liberador de levonorgestrel versus implante subdérmico liberador de etonogestrel no controle da dor pélvica em mulheres com endometriose.

Pesquisador: Nelsilene Mota Carvalho Tavares

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 44827415.2.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: MERCK SHARP & DOHME FARMACEUTICA LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.783.749

Apresentação do Projeto:

Resumo: Objetivos: Avaliar e comparar a eficácia do sistema intrauterino liberador de levonorgestrel (SIU-LNG) em relação ao implante subdérmico liberador de etonogestrel (ENG) no controle da dor pélvica crônica e/ou dismenorréia em mulheres com endometriose. Material e métodos: Serão avaliadas 100 mulheres, com idade entre 18-40 anos, com diagnóstico de endometriose confirmado por laparoscopia ou laparotomia que apresentarem dor pélvica crônica e/ou dismenorreia. O estudo será experimental, randomizado, comparativo, (50 mulheres serão alocadas ao SIU-LNG e 50 mulheres usarão o implante subdérmico de ENG.) As mulheres serão convidadas a participar do estudo no dia em que se apresentem no Ambulatório de Planejamento Familiar com queixas de dor pélvica e/ou dismenorréia com diagnóstico confirmado de endometriose na busca de inserção de um SIULNG. Nesse dia serão convidadas a ser alocadas por sorteio (através de um sistema de randomização gerado por computador; com envelopes opacos e selados), ao grupo que usará SIU-LNG ou implante subdérmico de ENG. Por ocasião da inclusão no estudo será realizada a inserção do SIU-LNG ou do implante de ENG e neste dia será aplicado o questionário de avaliação do índice de bem estar psicológico geral (PGWBI). Será entregue um calendário para registro diário do sangramento e a escala visual analógica (EVA) para controle diário da dor. As mulheres retornarão a cada 30 dias (± 3 dias) onde será avaliado o registro da

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

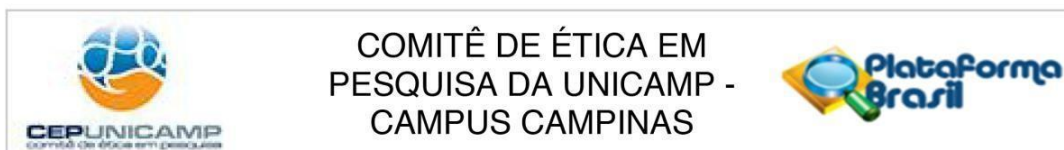
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.783.749

dor mediante a EVA e será recolhido o calendário de sangramento e entregue um novo para os próximos 30 dias. O fim do estudo está previsto para os 180 dias pós-inserção do SIU-LNG ou do implante e, nessa última avaliação, será aplicado novamente o PGWBI. Análise estatística: Teste t de Student será utilizado para as variáveis contínuas com distribuição normal e as variáveis sem distribuição normal serão avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas será utilizada para as variáveis dependentes numéricas. A comparação entre os grupos de tratamento será realizada pelo teste de Mann-Whitney. Palavras chaves: Endometriose, dor pélvica, sistema liberador de levonorgestrel, implante liberador de etonogestrel.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Comparar a eficácia do uso do SIU-LNG versus o uso do implante liberador de ENG no controle da dor pélvica, no padrão de sangramento e na qualidade de vida em mulheres com endometriose. **Objetivo Secundário:** Avaliar a eficácia do uso do SIU-LNG no controle da dor pélvica associada a endometriose Avaliar a eficácia do uso do implante liberador de ENG no controle da dor pélvica associada a endometriose Comparar a eficácia do uso do SIU-LNG versus do implante liberador de ENG no controle da dor pélvica associada a endometriose Avaliar o padrão do sangramento menstrual antes e após a inserção do SIU-LNG em mulheres com endometriose Avaliar o padrão do sangramento menstrual antes e após a inserção do implante liberador de ENG em mulheres com endometriose Comparar o padrão do sangramento menstrual antes e após a inserção do SIU-LNG versus o implante liberador de ENG em mulheres com endometriose Avaliar e comparar a qualidade de vida das usuárias do SIU-LNG e do implante de ENG aplicando o questionário PGWBI, antes da inserção do SIU-LNG ou do implante de ENG e após seis meses de seguimento. Avaliar e comparar os níveis de CA-125, antes da inserção do SIULNG ou do implante de ENG e após seis meses de seguimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

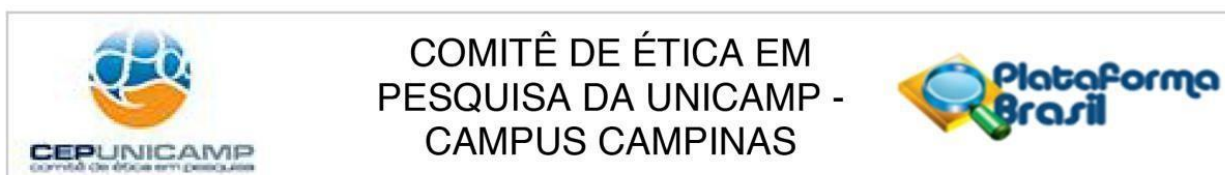
Riscos: Perfuração uterina por ocasião da inserção do SIU-LNG e formação de hematoma subdérmico durante a inserção do implante.

Benefícios: Uma nova abordagem de tratamento da endometriose, possibilitando o controle da doença por tempo prolongado, com melhor tolerabilidade e menos efeitos adversos que os tratamentos convencionais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta versão é uma emenda ao projeto aprovado pelo Parecer Consubstanciado CEP no. 1.080.778

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.783.749

de 26/05/2015, com a seguinte justificativa: “Venho solicitar a aprovação para inclusão, como instituição coparticipante, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CNPJ: 60.448.040/0001-22), assim como a inclusão do pesquisador Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão (CPF: 075.933.638-56) como membro de equipe no projeto supracitado, conforme carta de anuência em anexo nesta submissão. Esta solicitação justifica-se pela necessidade da complementação da casuística previamente determinada, de pacientes portadoras de endometriose, por ocasião da aprovação do projeto de pesquisa por este Comitê de Ética em Pesquisa.”

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nesta versão apresentou os seguintes documentos:

- 1) PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_802744_E1.pdf
- 2) TCLE_Centro_coparticipante_out2016.pdf
- 3) Justificativa_Emenda_Outubro2016.pdf
- 4) Carta_Anuencia_Prof_Dr_Mauricio_Simoes_Abrao.pdf documento assinado pelo Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão, responsável pelo setor de Endometriose do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Recomendações:

Lembrar que, de acordo com a resolução CONEP 466/12:

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda considerada aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

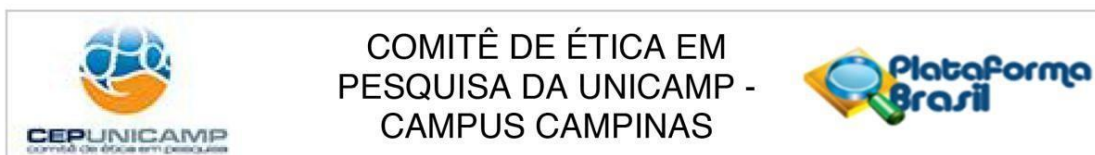
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

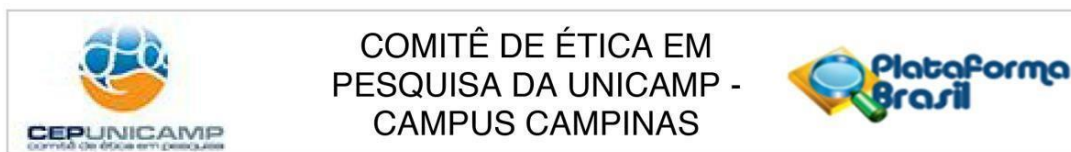


Continuação do Parecer: 1.783.749

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887		
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	



Continuação do Parecer: 1.783.749

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_802744_E1.pdf	04/10/2016 14:52:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Centro_coparticipante_out2016.pdf	04/10/2016 14:36:42	Nelsilene Mota Carvalho Tavares	Aceito
Outros	Justificativa_Emenda_Outubro2016.pdf	04/10/2016 14:36:31	Nelsilene Mota Carvalho Tavares	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_Prof_Dr_Mauricio_Simoes_Abrao.pdf	04/10/2016 14:35:17	Nelsilene Mota Carvalho Tavares	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Protocolo aprovação comissão de pesquisa.pdf	08/05/2015 12:53:31		Aceito
Parecer Anterior	Parecer Consubstanciado experimental.pdf	08/05/2015 12:52:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO DOUTORADO Nelsilene Tavares.pdf	07/05/2015 21:28:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de consentimento livre e esclarecido doc.pdf	07/05/2015 21:27:35		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	07/05/2015 21:01:58		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 20 de Outubro de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br